Synthesen von Somatostatin mit einer neuentwickelten säurelabilen Schutzgruppe

DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
Hubert Kalbacher
aus Rottweil

1980

Synthesen von Somatostatin mit einer neuentwickelten säurelabilen Schutzgruppe

DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
Hubert Kalbacher
aus Rottweil

1980

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung: 9.April 1980

Dekan:	Professor Dr. Michael Hanack
1.Berichterstatter:	Professor Dr.Wolfgang Voelter
2.Berichterstatter:	Professor Dr.Ernst Bayer

Die vorliegende Arbeit wurde mit Unterbrechungen in der Zeit von August 1975 bis September 1979 am Lehrstuhl für Organische Chemie I, Institut für Organische Chemie der Universität Tübingen, Direktor Professor Dr.E.Bayer, unter wissenschaftlicher Anleitung von Professor Dr.W.Voelter angefertigt.

Herrn Professor Dr.W.Voelter
danke ich herzlich für die Themenstellung, sein stetes Interesse und großzügige Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Herrn Professor Dr.E.Bayer
danke ich für die bereitwillige Überlassung von Instituts-einrichtungen.

Der Konrad-Adenauer-Stiftung, Bonn, sei für die Verleihung eines Promotionsstipendiums herzlich gedankt.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41549627_0024

Folgenden Damen und Herren bin ich zu Dank verpflichtet:

Für die korrekte Aufnahme zahlreicher Spektren möchte ich Fräulein Förstel (IR), Herrn Bartholomä und Dozent Dr. K.P.Zeller (MS, FD-MS), Herrn Dipl.Chem. W.Fuchs und Dipl.Chem. H.Horn (^{13}C-NMR, ^{1}H-NMR) danken. Fräulein Naumann sei für die Durchführung der Aminosäurenanalyse, Herrn G.Nicholson für die Durchführung des Racemattests und Herrn Wurmstich für die Elementaranalysen gedankt.

Fernerhin danke ich den Herren Dr. Przbylski und Dr. Lüderwald von der Universität Mainz für die Aufnahme zahlreicher FD-MS-Spektren.

Herrn Thomas Härtner und Fräulein Gabi Schacht danke ich für die eifrige und sorgfältige Ausführung präparativer Arbeiten im Labor.

FÜR URSEL

Folgende Abkürzungen werden verwendet:

Adpoc	=	1-(1-Adamantyl)-1-methylethoxycarbonyl
ACTH	=	Adrenocorticotropes Hormon; Corticotropin
Boc	=	tert.-Butyloxycarbonyl
Bzl	=	Benzylether
DCC	=	Dicyclohexylcarbodiimid
DMF	=	Dimethylformamid
DCHA	=	Dicyclohexylamin (ammonium)
HOBt	=	1-Hydroxybenzotriazol
HAc	=	Essigsäure
LTH	=	Luteotropes Hormon, Prolactin
MSH	=	Melanophorenstimulierendes Hormon
MeOH	=	Methanol
OMe	=	Methylester
PFT	=	Puls-Fourier-Transformation
OSu	=	N-Hydroxysuccinimidester
TSH	=	Thyreotropin
TFA	=	Trifluoressigsäure
Trt	=	Tritylether
TRH	=	Thyreotropin-"Releasing"-Hormon
THF	=	Tetrahydrofuran
Z	=	Benzyloxycarbonyl

Inhaltsverzeichnis

		Seite
I.	Einleitung	1
1.	Bildungsstätten der Hypothalamus-Regulationshormone	1
2.	Isolierung der Hypothalamus-Regulationshormone	1
3.	Somatostatin	3
3.1.	Isolierung des Somatostatins	3
3.2.	Struktur des Somatostatins	4
3.3.	Physiologische Wirkungen des Somatostatins	4
4.	Begründung und Darstellung des Themas	5
5.	Die Felddesorptions-Massenspektrometrie als spektroskopische Hilfe bei der Synthesekontrolle von Peptiden	6
II.	Allgemeiner Teil	10
1.	Synthesen des Somatostatins	10
III.	Spezieller Teil	11
1.	Überlegungen zur Syntheseplanung	11
2.	Schutz der SH-Funktion des Cysteins	12
3.	Synthese des N-terminalen Heptapeptidmethylesters Boc-Ala-Gly-Cys(Trt)-Lys(Boc)-Asn-Phe-Phe-OCH_3	14
3.1.	Darstellung von Boc-Ala-Gly-Cys(Trt)-OCH_3	14
3.2.	Darstellung von Z-Lys(Boc)-Asn-Phe-Phe-OMe	17
3.2.1.	Anmerkungen zur Syntheseoptimierung von Boc-Asn-ONp	22
3.3.	Synthese des Heptapeptidmethylesters Boc-Ala-Gly-Cys(Trt)-Lys(Boc)-Asn-Phe-Phe-OMe	23
4.	Synthese von Z-Trp-Lys(Boc)-Thr(Bzl)-Phe-OMe	26
4.1.	Verfolgung der Abspaltung von Benzylschutzgruppen mittels ^{1}H-NMR-Spektroskopie	27
5.	Synthese von H-Thr(Bzl)-Ser(Bzl)-Cys(Trt)-OH	30
6.	Synthese von Boc-Ala-Gly-Cys(Trt)-Lys(Boc)-Asn-Phe-Phe-Trp-Lys(Boc)-Thr(Bzl)-Phe-OMe	32
7.	Ergebnisse der Versuche zur Bildung des geschützten Somatostatins nach dem Syntheseweg 1	34
7.1.	Nebenreaktionen bei Azid-Kupplungen	36
7.2.	Azidkupplungen bei verschiedenen Reaktionsbedingungen	36

7.3.	Alternative Synthesen des Heptapeptids 8-14	38
7.4.	Überlegungen zu einer verbesserten Somatostatinsynthese	39
IV.	Entwicklung von neuen, säurelabilen Schutzgruppen	41
1.	Bekannte, säurelabile Aminoschutzgruppen	41
2.	Zielsetzung	41
3.	Theoretische Vorüberlegungen zur Synthese säurelabiler Schutzgruppen vom Urethantyp	42
4.	Die 1-Benzyl-1-methylethoxycarbonylgruppe (Bzpoc)	43
4.1.	Darstellung von Bzpoc-Aminosäuren	43
4.2.	Abspaltung der Bzpoc-Aminoschutzgruppe	45
5.	Die 1-(1-Adamantyl-)1-methylethoxycarbonyl-(Adpoc)-Gruppe	47
5.1.	Synthese der Ausgangsverbindungen und Einführungsreagenzien	48
5.1.1.	[1-(1-Adamantyl)-1-methylethyl]phenylcarbonat (Adpoc-OPh)	51
5.1.2.	2-[(1-Adamantyl)-isopropyl-2-hydroximino]-2-phenyl-acetonitril oder Adpoc-ON	52
5.1.3.	Fluorameisensäure-[1-(1-Adamantyl)-1-methylethyl]-ester (Adpoc-F)	52
5.2.	^{13}C-NMR-Spektroskopie von Adpoc-Aminosäuren	52
5.3.	Bestimmung der Spaltgeschwindigkeiten mittels HPLC	59
5.3.1.	Abspaltung der N^{α}-Adpoc-Gruppe in Anwesenheit einer N^{ε}-Boc-Gruppe	61
5.4.	Abspaltungsmechanismus	65
5.5.	Stabilität der Adpoc-Aminosäuren	66
V.	Synthese von Somatostatin mit Hilfe der Adpoc-Gruppe (Syntheseweg 2)	68
1.	Darstellung des Heptapeptids H-Trp-Lys(Z)-Thr(Bzl)-Phe-Thr(Bzl)-Ser(Bzl)-Cys(Trt)-OH	68
2.	Saure Entfernung der Schutzgruppen und Oxidation zum cyclischen Somatostatin	72
2.1.	Ergebnisse der Abspaltungsreaktionen	74
2.1.1.	Abspaltung mit Trifluormethansulfonsäure	74

2.1.2.	Abspaltung mit Bortristrifluoracetat (BTFA)	74
2.1.3.	Abspaltung mit HF-Anisol-Ethandithiol	75
3.	Synthese des Heptapeptids H-Trp-Lys(Boc)-Thr(Bu^t)-Phe-Thr(Bu^t)-Ser(Bu^t)-Cys(Trt)-OH Syntheseweg 3	80
IV.	Experimenteller Teil	92
A	Spektroskopische Methoden	92
B	Chromatographische Methoden	92
C	Sonstiges	94
D	Chemikalien	94
2.	Herstellung von 1-(1-Adamantyl)-1-methyl-ethoxycarbonyl-Aminosäuren	96
2.1.	Adamantan-carbonsäure-(1)-ethylester	96
2.2.	2-(1-Adamantyl-)2-propanol	96
2.3.	Adpoc-OPh als Einführungsreagens	97
2.4.	Herstellung der Adpoc-Aminosäuren über das Adpoc-Phenylcarbonat	97
2.5.	Adpoc-F als Einführungsreagens	98
2.6.	Herstellung der Adpoc-Aminosäuren über das Adpoc-F	99
2.7.	Adpoc-ON als Einführungsreagens	99
2.8.	Adpoc-ON	100
2.9.	Einführung der Adpoc-Gruppe in Aminosäuren mittels Adpoc-ON	100
3.	Herstellung von 2-Benzyl-isopropyloxy-carbonyl(Bzpoc)-Aminosäuren	101
3.1.	Darstellung von Dimethyl-benzyl-carbinol (2-Benzyl-2-propanol)	101
3.2.	Darstellung von 2-Benzyl-propyl-(2)-phe-nylcarbonat	102
3.3.	Einführung der 2-Benzyl-isopropyl-Gruppe (Bzpoc)-in Aminosäuren	102
4.	Synthese von Somatostatin	103
4.1.	Fragment 1-7: Boc-Ala-Gly-Cys(Trt)-Lys(Boc)-Asn-Phe-Phe-NH-NH_2	103
4.2.	Synthese von Somatostatin, Syntheseweg 1	113
4.3.	Sequenz 1-11	117
4.4.	Fragment 12-14	118
5.	Synthese von Somatostatin; Syntheseweg 2	120

5.1.	Darstellung der Sequenz 8-14	120
5.2.	Darstellung der Sequenz 1-14	127
5.3.	Darstellung von cyclischem Somatostatin	128
5.3.1.	Abspaltung mit HF-Anisol-Ethandithiol	128
5.3.2.	Abspaltung mit Bortristrifluoracetat (BTFA)	131
6.	Synthese von Somatostatin,Syntheseweg 3	132
6.1.	Darstellung der Sequenz 8-14	132
6.2.	Darstellung der Sequenz 1-14	143
VII.	Zusammenfassung	147
VIII.	Literaturverzeichnis	150

I. EINLEITUNG

1. Bildungsstätten der Hypothalamus-Regulationshormone

Dem Hypothalamus, einem Gebiet des Zwischenhirns, kommt innerhalb des endokrinen Systems die Bedeutung eines Steuerungs- und Integrationszentrums zu, in welchem affektive Reize und Impulse des Menschen und Rückmeldungen von Schilddrüse, Nebennierenrinde und Gonaden über den aktuellen Hormonspiegel im Blutplasma koordiniert und verarbeitet werden. Zur Übertragung und Weiterleitung dieser Impulse werden in verschiedenen Kerngebieten, vor allem der Eminentia mediana relativ kurzkettige Peptide gebildet [1,2]:

a) Die großzelligen Kerngebiete des Nucleus supraopticus und Nucleus paraventricularis sind die Bildungsstätten von Oxytocin und Vasopressin.

b) Die kleinzelligen Kerngebiete des Nucleus infundibularis sind die Bildungsstätten der Hypothalamus-Regulationshormone.

Im Gegensatz zum seit längerer Zeit bekannten Oxytocin, das auf neutralem Wege vom Hypothalamus zum Hypophysenhinterlappen gelangt, dort an das Blut abgegeben und direkt auf die glatte Muskulatur des schwangeren Uterus bzw. der Brustdrüse wirkt, gelangen die Hypothalamus-Regulationshormone über ein spezialisiertes Gefäßsystem zum Hypophysenvorderlappen und bewirken dort die Bildung und Freisetzung verschiedener Hormone, wie z.B. Corticotropin (ACTH), Thyreotropes Hormon (TSH), Luteotropes Hormon (Prolactin, LTH), Wachstumshormon (Somatotropin, STH, GH) oder Melanocyten-stimulierendes Hormon (MSH) [1-9] (s.Abb.1).

2. Isolierung der Hypothalamus-Regulationshormone

Die äußerst niedere Gewebskonzentration der Hypothalamus-Regulationshormone erschwerte die Isolierung und Identifizierung dieser Substanzen außerordentlich. Erst durch die Entwicklung

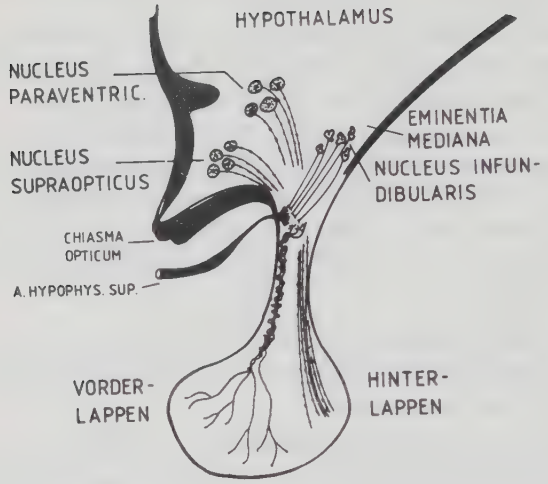


Abb. 1: Schematischer Aufbau des Hypothalamus-Hypophysensystems. Die in den kleinzelligen Kernen der Eminentia mediana gebildeten Hypothalamus-Regulationshormone werden über das Portalgefäßsystem dem Hypophysenvorderlappen zugeführt.

neuer hochsensitiver biologischer Nachweismethoden und verbesserter Isolierungstechniken gelang es schließlich, aus etwa 300 000 Hypothalamifragmenten ca. 1 mg des Thyreotropin-freisetzenden Hormons (TRH) zu isolieren, die Struktur aufzuklären und die Identität durch Synthese zu beweisen (Schally, Guillemin, 1969) [10,11].

Kurze Zeit darauf gelang den beiden Forschergruppen die Isolierung des Gonadotropin-freisetzenden Hormons (Gn-RH; LH/FSH-RH) [12,13]. Beide Substanzen bzw. Derivate davon haben heute in der klinischen Diagnostik und bei der therapeutischen Behandlung von Fertilitätsstörungen der Frau große

Bedeutung erlangt [4,14]. Die Verwendung von TRH bei der Behandlung endogener Depressionen ist Gegenstand vieler Untersuchungen [15-19].

Obwohl als sicher angenommen werden kann, daß weitere Hypophysenvorderlappenhormone durch "Releasing"-Hormone gesteuert werden, gelang bislang noch keine Reindarstellung weiterer Substanzen. Die Strukturvorschläge für Corticotropin-freisetzendes Hormon (CRH), Somatotropin-freisetzendes Hormon (GH-RH), Prolactin-freisetzendes Hormon (PRF) und Melanotropin-freisetzendes Hormon (MRF) konnten bislang nicht bestätigt werden [3,4,6,8].

3. Somatostatin

3.1. Isolierung des Somatostatins

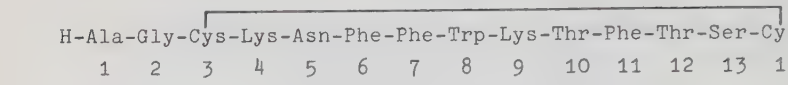
Außer den beiden Gehirnpeptiden mit hormonfreisetzender Wirkung kennt man bisher nur die Struktur eines Peptidhormons mit Hormonfreisetzung-hemmender Wirkung. Dieses Somatotropinfreisetzung-hemmende Hormon (GH-RIH, SRIF, GIF), kurz Somatostatin genannt, wurde 1973 von der Arbeitsgruppe Guillemin aus Schafhypothalami isoliert und in seiner Struktur aufgeklärt [20, 21]. 1976 gelang Schally die Darstellung des Somatostatins auch aus Schweinehypothalami [22].

Zur Isolierung wurden 500 000 Schafshypothalamusfragmente (2 kg) durch verschiedene Extraktionsschritte aufbereitet, durch nachfolgende Ionenaustauschchromatographie über Carboxymethylcellulose und Gelfiltration an Sephadex G 25 (in 0.5 m Essigsäure) angereichert und schließlich durch Verteilungschromatographie (G 25, Butanol-Eisessig-Wasser 4:1:5) gereinigt. Als Endprodukt wurden 8.5 mg einer Substanz erhalten, welche 75 Gewichtsprozente an Aminosäuren enthielt.

Durch Totalhydrolyse mittels 6 N HCl, Edmanabbau , Trypsin und Chymotrypsinspaltung wurde schließlich die Sequenz von Somatostatin ermittelt [20,21].

3.2. Struktur des Somatostatins

Somatostatin ist ein heterodet cyclisches homöomeres Tetradecapeptid mit folgender Primärstruktur



Durch die Ausbildung einer Disulfidbrücke zwischen den Positionen 3 und 14 entsteht ein 38-gliedriges Ringsystem mit einer ß-Struktur [23-25, 54]. Interessanterweise zeigen die offenkettige, reduzierte Form (Dihydrosomatostatin) als auch die oxydierte Form (Somatostatin) nahezu gleiche biologische Aktivität.

Die in den nachfolgenden Kapiteln beschriebenen Synthesen von Somatostatin haben die cyclisierte Form zum Ziel.

3.3. Physiologische Wirkungen des Somatostatins

Somatostatin besitzt ein weitaus vielfältigeres Wirkungsspektrum, als man es von einem "Inhibiting factor" aus dem Hypothalamus vermutet hätte. Neben der Hemmwirkung auf die Wachstumshormonfreisetzung blockiert Somatostatin die Sekretion zahlreicher anderer Hormone, wie die von TSH, FSH, Insulin oder Glucagon.

Bei den Hormonen des Magen-Darm-Trakts wird die Sekretion von Gastrin und Secretin, sowie die Magensäureproduktion gehemmt. Somatostatin läßt sich auch außerhalb des Hypothalamus nachweisen: In anderen Hirnregionen, im Magen, Dünndarm und besonders in den Inselzellen des Pankreas [26-31].

Die Hemmwirkung auf die Glucagonausschüttung ist zweifellos eine der interessantesten Eigenschaften des Somatostatins und läßt für die Behandlung des Diabetes völlig neue Therapiemöglichkeiten erwarten [6,32].

4. Begründung und Darstellung des Themas

Eine Fülle von Erkenntnissen über Ätiologie und Therapie von Störungen des Hormonsystems ist erst durch die synthetische Herstellung dieser Regulations-Hormone möglich geworden. Die therapeutischen Möglichkeiten dieser Klasse biologisch aktiver Substanzen sind jedoch bei weitem nicht ausgeschöpft. So erhofft man sich von Somatostatin Erfolge bei der Behandlung der Akromegalie und besonders wegen seiner Wirkung auf die Glucagonausschüttung bei der Therapie für insulinpflichtige Diabetiker (etwa 2-3 % der bundesdeutschen Bevölkerung) [6, 30,32]. Die geringe Verfügbarkeit an biologischem Material erfordert daher Synthesewege, welche die Darstellung möglichst reiner, in guten Ausbeuten erhältlicher Mengen an Somatostatin erlauben. Da die Synthese von biologisch aktiven Peptiden nach der Festphasenmethode oft zu schwierig abtrennbaren Nebenprodukten führen kann [33-37] und teilweise drastische Abspaltungsbedingungen die zur partiellen Zerstörung des Moleküls führen können, erforderlich sind [38], wurde versucht, das Molekül nach Methoden der klassischen Peptidchemie herzustellen. Hierfür wurden 3 Synthesewege eingeschlagen, wobei jedoch nur zwei davon zum Erfolg führten.

Erstmalig wurde eine eigens dafür entwickelte, säurelabile Aminoschutzgruppe eingesetzt, welche erlaubte, die acidolytische Belastbarkeit während und am Ende der Synthese deutlich zu reduzieren [39-42]. Die Eigenschaften der Aminoschutzgruppe wurden durch Hochdruckflüssigkeitschromatographie-Messungen geprüft und die Eignung der Gruppe für die Peptidchemie durch die Totalsynthese des Somatostatins bewiesen.

Zwischenverbindungen wurden durch ^{13}C-NMR-Messungen und durch FD-MS-Messungen charakterisiert.

Die biologische Aktivität des Produkts wurde durch Untersuchungen bestätigt.

5. Die Felddesorptions-Massenspektrometrie als spektroskopische Hilfe bei der Synthesekontrolle von Peptiden

Der Syntheseverlauf von geschützten, höheren Peptiden läßt sich oft nur schwierig kontrollieren. Wertvolle Hilfe leistet die ^{13}C-NMR-Spektroskopie, die sich - insbesondere seit der Einführung der Puls-Fourier-Transform-Technik (PFT) - für peptidchemische Untersuchungen zu einer Routinemethode entwickelt hat [93]. Nachteilig ist jedoch der relativ hohe Aufwand an Substanzmenge (200 - 300 mg/Probe).

Die Anwendung der Elektronenstoß(EI)-Massenspektrometrie bei der Untersuchung von Peptiden ist stark begrenzt. Aufgrund ihrer geringen Flüchtigkeit kann oft kein bzw. nur ein schwacher Molekülpeak beobachtet werden; zusätzlich können beim Verdampfungsprozeß thermische Zerfallsprozesse auftreten. Trotz chemischer Derivatisierungsmethoden ist die Anwendung meist auf niedere Peptide beschränkt. Demgegenüber werden bei der Felddesorptions-Massenspektrometrie die Ionen in einem Bereich sehr hoher Feldstärke erzeugt; die Probe wird zu Beginn der Analyse auf der Emitteroberfläche (meist Wolfram-Drahtemitter) adsorbiert. Bei FD entfällt somit ein separater Verdampfungsprozess der Probe, wodurch ein thermischer Zerfall vor der Ionisierung weitgehend unterdrückt wird. Bedingt durch diese Art der Probenzufuhr werden die Ionen bei der Felddesorption vorwiegend im Kontakt mit der Oberfläche gebildet. Dabei entstehen die Ionen sowohl durch das hohe elektrische Feld (Bildung von M^+-Ionen) als auch durch feldinduzierte Oberflächenreaktionen (Anlagerung von Protonen z.B. $[M+H]^+$

Durch das Fehlen eines separaten Verdampfungsprozesses, die schonende Ionisierung und die Möglichkeit der Energierelaxation der gebildeten Ionen erscheinen die Spektren gegenüber der Elektronenstoßionisation stark vereinfacht. Es kommt zur Ausbildung von intensiven Molekülionen oder protonierten Molekülionen. Wegen der schonenden Ionisierung

direkt aus der festen Phase ist die FD-Technik besonders zur Analyse schwer flüchtiger und thermisch labiler Substanzen,z.B. Peptiden, geeignet.

Im Rahmen dieser Arbeit kann die FD-Technik wichtige Sequenzinformationen geben. Neben der Bestätigung von Synthesezwischenprodukten bis zu einem Molekulargewicht von 1995, kann durch die Felddesorptions-Massenspektrometrie die selektive Abspaltung der N-terminalen, säure- und thermolabilen Adpoc-Gruppe am Beispiel des nur mit säurelabilen Schutzgruppen geschützten Heptapeptids Adpoc-Trp-Lys(Boc)-Thr(Bu^t)-Phe-Thr(Bu^t)-Ser(Bu^t)-Cys(Trt)-OH gezeigt werden.

Da bislang kaum FD-Spektren über geschützte Peptide vorliegen, werden zu Beginn einige einfache Aminosäurederivate mittels der FD-Technik vermessen.Die auftretenden strukturrelevanten Fragmentierungen werden als Interpretationshilfe für die folgenden höheren Peptide verwendet. Abb. 6 ist ein Beispiel dafür, daß auch Substanzen, welche thermolabile Gruppen tragen oder in Salzform vorliegen, mit der FD-Methode aussagekräftige Massenspektren liefern.

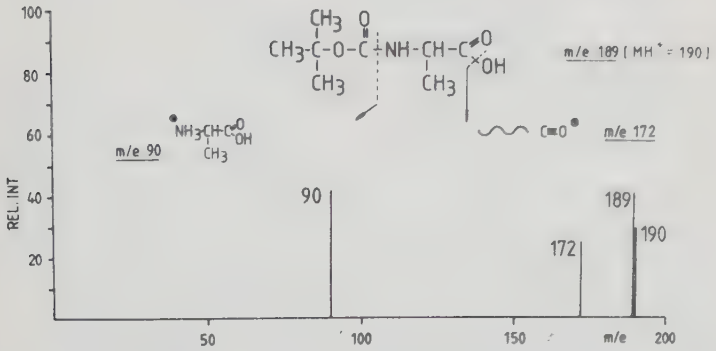


Abb. 2: FD-MS-Spektrum von Boc-Ala-OH.(Emitterheizstrom 8mA).

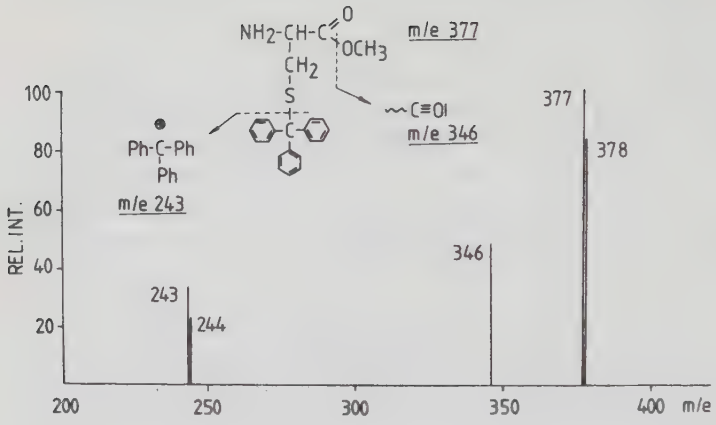


Abb. 3: FD-MS-Spektrum von H-Cys(Trt)-OCH_3.(Emitterheizstrom 6 mA).

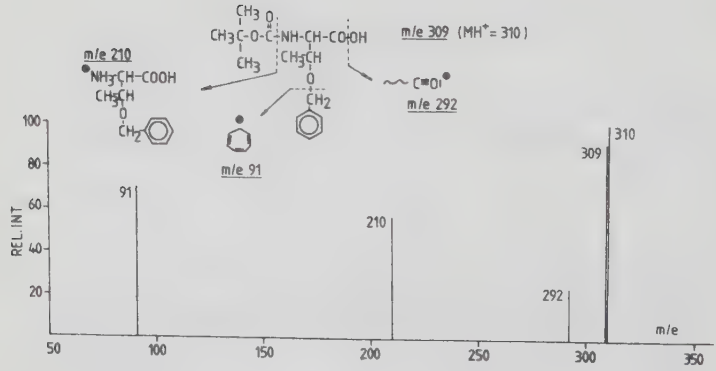


Abb. 4: FD-MS-Spektrum von Boc-Thr(Bzl)-OH.(Emitterheizstrom 13 mA).

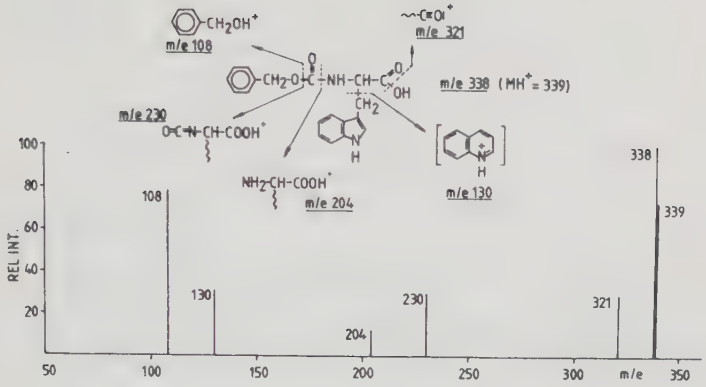


Abb. 5: FD-MS-Spektrum von Z-Trp-OH.(Ermitterheizstrom 12 mA).

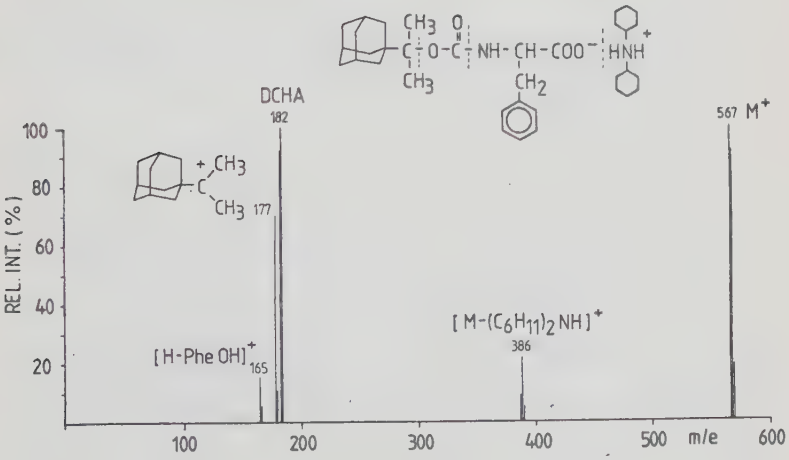


Abb. 6: FD-MS-Spektrum von Adpoc-Phe DCHA.(Emitterheizstrom 15 mA).

II. ALLGEMEINER TEIL

1. Synthesen des Somatostatins

Gleich nach Bekanntwerden der Struktur von Somatostatin sind mehrere Festphasensynthesen publiziert worden [43-47]. Eine Reihe biologisch aktiver Derivate wurde ebenfalls nach diesem Syntheseverfahren hergestellt. Es ist auch heute noch umstritten, ob Peptidhormone, die nach diesem Verfahren hergestellt wurden, für medizinische Zwecke verwendet werden können [3,5]. Neben dem Auftreten von Rumpf- und Fehlsequenzen bedingt durch den nicht vollständigen Kupplungsumsatz bzw. teilweiser Abspaltung von Schutzgruppen trifunktioneller Aminosäuren während der repetitiven acidolytischen Deblockierungsschritte, wird Tryptophan während der Säurebehandlungen nicht unwesentlich in Mitleidenschaft gezogen [38, 94, 95].

Ein weiterer Aspekt, welcher bislang nur geringe Beachtung gefunden hat, ist die Erhaltung der optischen Aktivität der Aminosäuren bei Kupplungen nach der Festphasenmethode. Jüngste Untersuchungen konnten aufzeigen, daß unter Kupplungsbedingungen, wie sie bei der Festphasensynthese üblich sind, (Aktivierungen mit Dicyclohexylcarbodiimid bei Raumtemperatur, keine Zusatzkomponente wie HOBt) Racemisierungsraten bis zu 30 % auftreten können [55-58].

Eine wesentliche Weiterentwicklung und Verbesserung der Trägersynthese stellt die von Bayer et al. weiterentwickelte Liquid-Phase-Methode dar, die Polyethylenglycole verschiedenen Molekulargewichts als lösliche, polymere Carboxylschutzgruppe einsetzt [59,60]. Die hierbei resultierenden Vorteile, wie einfache Reinigungsoperationen, schnelle und hinreichend genaue Bestimmung der Umsatzkontrolle mittels potentiometrische Titration im wässrigen Medium und gute Löslichkeitseigenschaften des Trägerpeptids in organischen Lösungsmitteln wurden anhand einer Somatostatinsynthese demonstriert [61].

Die experimentellen Arbeiten bisher beschriebener Somatostatinsynthesen, welche "klassische" Methoden zur Darstellung verwenden, sind nur dürftig oder gar nicht angegeben [48-52], sodaß in dieser Arbeit versucht werden soll, Somatostatin nach einem neuen Syntheseweg auf klassische Weise herzustellen.

III. SPEZIELLER TEIL

1. Überlegungen zur Syntheseplanung

Für den Synthetiker stellt Somatostatin ein relativ anspruchsvolles Molekül dar. Mehr als die Hälfte der enthaltenden Aminosäuren sind trifunktioneller Natur, der Indolring des Tryptophans kann sowohl durch Oxidation als auch durch starke acidolytische Bedingungen zerstört werden; weiterhin liegt Somatostatin im Gegensatz zu den "Releasing"-Hormonen sowohl am N-terminalen als auch am C-terminalen Ende in freier, ungeschützter Form vor; schließlich stellt die intramolekulare Cyclisierung einen Prozeß dar, welcher trotz geeigneter Bedingungen (Cyclisierung nach dem Ruggli-Ziegler-Prinzip) mit erheblichen Nebenprodukten (Polymerenbildung) und daher mit geringen Ausbeuten verläuft. Für die Synthesen des Somatostatins wurden daher folgende Anforderungen gestellt:

a) Die optische Reinheit soll durch Verwendung möglichst racemisierungsarmer Methoden erhalten bleiben. Die kürzlich angestellten Untersuchungen zeigen, daß die verwendeten Kupplungsmethoden DCCI/HOBt [55,57,63,64], N-hydroxysuccinimidester [56,65], p-Nitrophenylester/HOBt [66,67] und Azidkupplungen nach Honzl-Rudinger [68,69] diese Bedingungen erfüllen.

b) Esterverseifungen mit Alkali stellen nicht nur ein Racemisierungsrisiko dar, sondern geben oft auch zur Bildung von Nebenprodukten Anlaß [70]. Die Anzahl dieser Schritte

soll daher auf ein Minimum beschränkt bleiben.

c) Um die Synthese ökonomisch zu gestalten, sollen Aminosäuren, welche mehrfach im Molekül vorkommen, möglichst durch gleiche Derivatisierungsformen eingesetzt werden.

d) Um die acidolytische Belastbarkeit nieder zu halten, sollen nur Schutzgruppen Anwendung finden, die eine schonende Abspaltung erlauben.

Verwendung finden daher Boc und Z als Aminoschutzgruppen und Trityl als Thiolschutz für Cystein. Threonin und Serin werden zunächst als Benzylether geschützt; durch die Verwendung der neuen Adpoc-Gruppe als Aminoschutz können Threonin und Serin in Form ihrer O-tert.-Butylether geschützt werden. Dadurch kann am Ende auf eine HF-Hydrolyse verzichtet werden, welche nicht nur einen speziellen apparativen Aufwand erfordert, sondern auch zur Bildung zahlreicher Nebenprodukte Anlaß geben kann.

e) Die Löslichkeit der Teilfragmente soll genügend hoch sein, um die in der Peptidchemie üblichen Methoden ohne Schwierigkeiten anwenden zu können.

Durch Verwendung der hydrophoben Adpoc-Gruppe wird die Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln stark gesteigert, sodaß selbst höhere Peptide noch in Essigester/Ether löslich sind und durch konventionelle Waschoperationen aufgereinigt werden können.

2. Schutz der SH-Funktion des Cysteins

Dem Schutz der Thiolgruppierung des Cysteins kommt während der Synthese des Somatostatins eine zentrale Bedeutung zu. Die Forderung nach hinreichender Stabilität während und milder Abspaltung am Ende der Synthese können nur wenige Thiolschutzgruppen erfüllen.

Die häufig eingesetzte S-Benzyl-Gruppe benötigt drastische Abspaltungsbedingungen (Na/NH_3), wobei oft Bindungsspaltungen und Desulfurierungen auftreten können. Die Abspaltung mit HF verläuft nicht vollständig [38,71].

Als selektive SH-Schutzgruppen, die unter milden Bedingungen entfernt werden können, kommen S-Ethylmercapto, S-Acetamidomethyl und S-Trityl in Betracht [38]. Entgegen früherer Untersuchungen konnte durch Kunzek [72] gezeigt werden, daß der S-Ethylmercaptorest gegenüber Alkali und bei Hydrazinolysen nur begrenzte Stabilität aufweist (Disulfidaustauschreaktionen, Entschwefelung durch ß-Eliminierung). Zwar ist auch die S-Tritylschutzgruppe - wie jüngste Untersuchungen von König zeigen [73] - in verschiedenen Säuregemischen nicht komplett abspaltbar, dagegen läßt sich der S-Tritylrest nach Kamber und Rittel milde und schnell mit Iod in Methanol oxydativ entfernen, wobei direkt das entsprechende Cystinderivat erhalten wird.

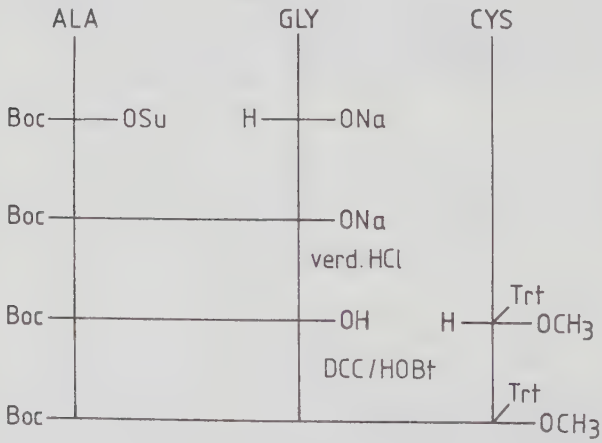
Da die S-Tritylgruppe zusätzlich stark solubilisierende Eigenschaften in organischen Lösungsmitteln besitzt, welche bei der Synthese höherer Peptide eine bedeutende Rolle spielen, wurde dieser Gruppe der Vorzug gegeben.

3. Synthese des N-terminalen Heptapeptidmethylesters Boc-Ala-Gly-Cys(Trt)-Lys(Boc)-Asn-Phe-Phe-OCH_3

3.1. Darstellung von Boc-Ala-Gly-Cys(Trt)-OCH_3 (Fragment 1-3)

Aus voranstehenden Überlegungen heraus wird ein Synthesekonzept entwickelt, wonach Somatostatin durch Fragmentkondensation der Fragmente [(3+4) + 4] +3 aufgebaut werden soll. Um die Aminosäure Tryptophan möglichst wenigen destruktiven Bedingungen auszusetzen, wird ein Fragmentierungsschnitt zwischen den Positionen 7 und 8 gelegt.

Allen 3 Synthesewegen gemeinsam ist die Synthese des geschützten Heptapeptidmethylesters Boc-Ala-Gly-Cys(Trt)-Lys(Boc)-Asn-Phe-Phe-OMe.



Syntheseschema 1: Darstellung von Boc-Ala-Gly-Cys(Trt)-OMe.

Die für den Peptidchemiker als trivial erscheinende Knüpfung der Ala-Gly-Bindung neigt bei üblichen Kupplungen mit Dicyclohexylcarbodiimid (ebenso wie die Gly-Gly-Bindungsknüpfung[74]) zu erheblichen Anteilen an schlecht abtrennbaren N-Acylharnstoffderivaten. Diese von uns während der Enkephalinsynthese gemachten Erfahrungen[77,78] wurden inzwischen durch genaue Untersuchungen polnischer Autoren quantifiziert[75,76]. Zur Umgehung dieser Nebenprodukte wird Boc-Ala-OSu direkt mit dem Natriumsalz des Glycins zum C-terminal freien Dipeptid umgesetzt, was in guten Ausbeuten zu einem kristallinen, dünnschichtchromatographisch einheitlichen, kondensationsfähigen Dipeptid führt. Die weitere Umsetzung mit dem S-Trityl-cysteinmethylester nach der DCCI/HOBt-Methode liefert in 72 % Ausbeute den geschützten Tripeptidmethylester.

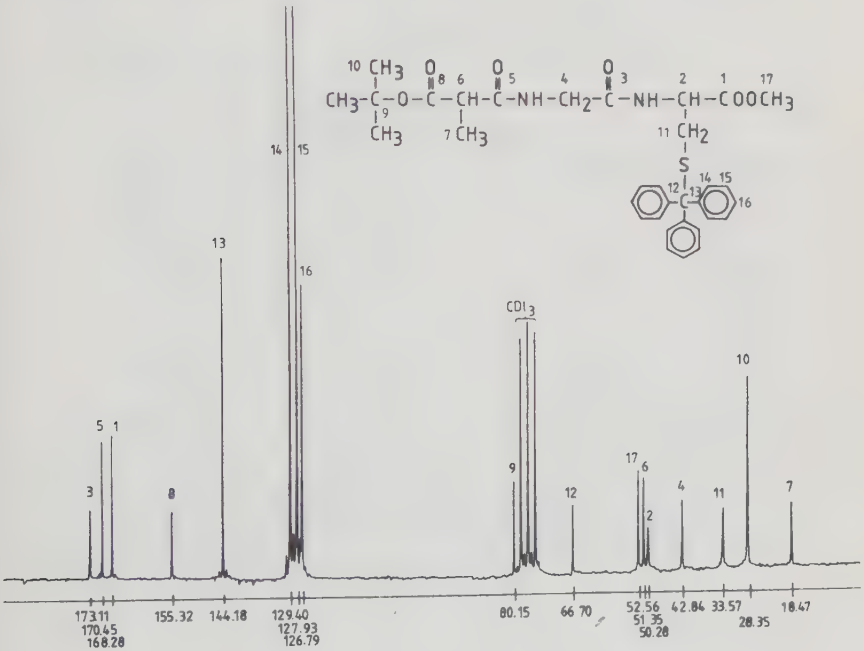


Abb.7: ^{13}C-NMR Spektrum von Boc-Ala-Gly-Cys(Trt)-OMe; protonenbreitbandentkoppelt, 20.115 MHz, 200 mg in 1 ml $CDCl_3$, 53003 Pulsinterferogramme.

Abb. 7 zeigt das FD-MS-Spektrum des N-terminalen Tripeptidmethylésters und das zugehörige Fragmentierungsmuster. Das linienarme Spektrum zeigt neben einem deutlich ausgeprägten Molekülpeak (I_{Rel}: 92 %) bzw. $(M + H)^+$-Peak (Basispeak) die bei den einfachen Aminosäurederivaten ermittelten strukturrelevanten Fragmentierungen (siehe I.5.). Die bei m/e 243, 244 bzw. m/e $(M-243, 244)^+$ auftretenden Ionenpeaks sind für S-Tritylcysteinverbindungen charakteristisch und werden auch bei höheren Peptiden deutlich beobachtet.

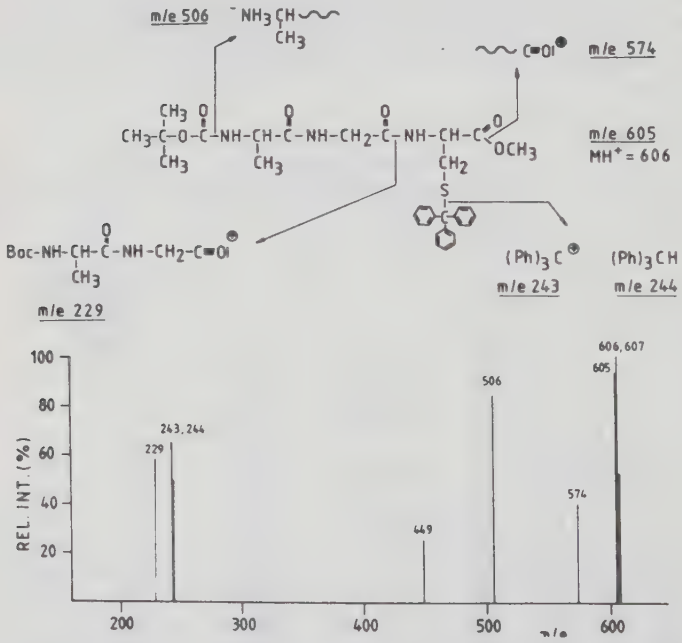


Abb. 8: FD-MS-Spektrum von Boc-Ala-Gly-Cys(Trt)-OMe (Emitterheizstrom 10 mA).

3.2. Darstellung von Z-Lys(Boc)-Asn-Phe-Phe-OMe (Fragment 4-7)

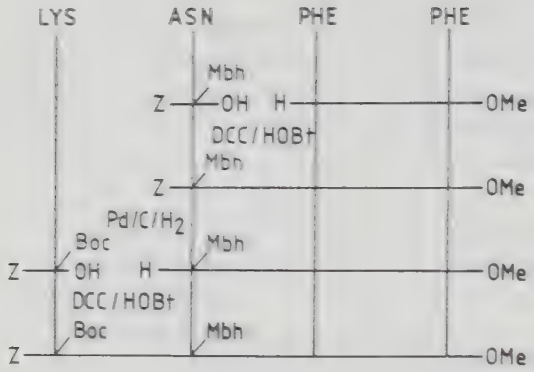
Bekanntlich neigt Asparagin unter Aktivierungsbedingungen mit Dicyclohexylcarbodiimid zu Dehydratisierungen zum entsprechenden ß-Cyanoalanin. Dieses kann im Dünnschichtchromatogramm aufgrund seiner grünen Färbung mit Ninhydrin leicht erkannt werden. Meist wird Asparagin daher in Form des p-Nitrophenyl-(-ONp)-Esters in das Peptidgerüst inkorporiert, obwohl bei der Darstellung dieses Aktivesters ebenfalls nicht unbeträchtliche Mengen an Cyanoalanin entstehen [80]. Eine Reindarstellung beider Substanzen gelang Schnabel durch Gegenstromverteilung[80].

Nach König und Geiger kann die Amidfunktion wirksam mit dem hydrophoben 4,4'-Dimethoxybenzhydryl (Mbh-)Rest geschützt werden[81]; andererseits sollen unter Aktivierungsbedingungen mit Dicyclohexylcarbodiimid unter Zusatz von 1-Hydroxybenzotriazol keine meßbaren Anteile von Nitrilkomponente entstehen [87].

Um für die Synthese hinsichtlich Reinheit und Ausbeute Aussagen treffen zu können, werden für den Aufbau des Tetrapeptidmethylesters folgende Wege beschritten:

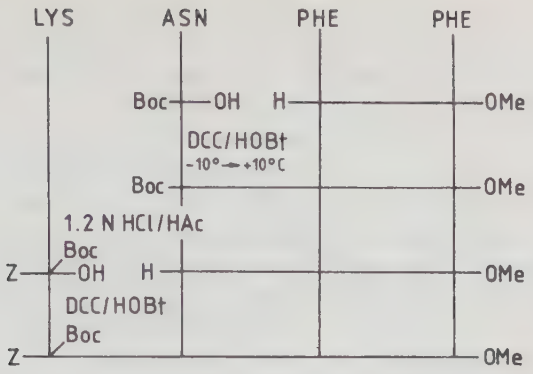
a) ß-Carbonamidfunktion geschützt: Inkorporation von Asparagin als Z-Asn(Mbh)-OH mit Dicyclohexylcarbodiimid/1-Hydroxybenzotriazol,
b) ß-Carbonamidfunktion ungeschützt: Kupplung als Boc-Asn-OH mit Dicyclohexylcarbodiimid/1-Hydroxybenzotriazol und
c) ß-Carbonamidfunktion ungeschützt: Kupplung als Boc-Asn-ONp unter Zusatz von 1-Hydroxybenzotriazol.

N-terminale Startkomponente ist in allen Fällen Phenylalanylphenylalaninmethylester·Hydrochlorid (H-Phe-Phe-OMe.HCl), welche durch DCC/HOBt-Kupplung von N-tert.-Butyloxycarbonyl-phenylalanin und Phenylalaninmethylester und anschließender Entfernung der Boc-Gruppe mit 1.2 N HCl/Eisessig leicht und in großen Ausbeuten erhalten werden kann.

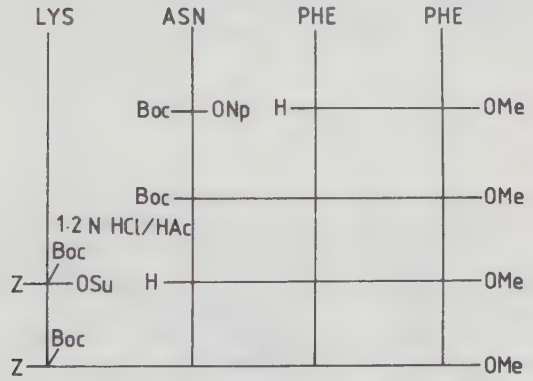


Syntheseschema 2: Synthese von Z-Lys(Boc)-Asn-Phe-Phe-OMe mittels Mbh-geschützter ß-Carbonamidfunktion (Weg a).

Der Einbau des hydrophoben 4,4'-Dimethoxybenzhydrylrestes in das Peptidgerüst nach obenstehendem Reaktionsschema führt zu einer drastischen Löslichkeitsverschlechterung des entstehenden Tripeptids in organischen Lösungsmitteln; nach erfolgter Freisetzung der Aminogruppe durch katalytische Hydrierung in warmen DMF (~30°C) wird zum geschätzten Tetrapeptidmethylester umgesetzt. Diese Verbindung ist nur noch in heißem Dimethylformamid löslich. Die mit zunehmender Kettenlänge des Peptids zu erwartenden weiteren Löslichkeitsverschlechterungen lassen eine Weiterverwendung dieses Peptids nicht mehr ratsam erscheinen.



Syntheseschema 3: Synthese von Z-Lys(Boc)-Asn-Phe-Phe-OMe mittels ungeschützter ß-Carbonamidfunktion (Weg b).



Syntheseschema 4: Synthese von Z-Lys(Boc)-Asn-Phe-Phe-OMe mittels ungeschützter ß-Carbonamidfunktion (Weg c).

Die nach Syntheseschema 3 und 4 erhaltenen Tripeptide Boc-Asn-Phe-Phe-OMe werden hinsichtlich ihrer Ausbeute, optischen Drehung, Elementaranalyse und ^{13}C-NMR-Spektroskopie miteinander verglichen.

Methode	Fp (°C)	20 (c=1,DMF)		Elementaranalyse C	H	N	Ausbeute (%)
-ONp	194-195	-35.6		62.39	6.77	1o.17	84.3
DCC/HOBt	191-194	-36.8		61.85	6.75	1o.45	74.3
			Ber.	62.6o	6.71	1o.36	

Obwohl nach der Aufarbeitung in beiden Fällen dünnschichtchromatographisch einheitliche und identische Produkte erhalten werden, zeigt das nach Schema 4 gekuppelte Produkt neben der höheren Ausbeute auch einen schärferen Schmelzpunkt. Die Infrarotspektroskopie zeigt, daß das mittels der Aktivestermethode gekuppelte Tripeptid keinerlei, das mittels der DCC/HOBt-Kupplungsmethode erhaltene Produkt schwache Anteile nitrilhaltiger Komponenten (schwache Bande bei 2250 cm^{-1}) enthält (Abb. 9).

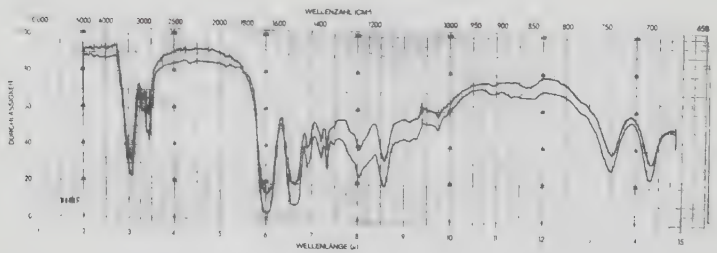


Abb. 9: IR-Spektrum von Boc-Asn-Phe-Phe-OMe, aufgenommen in KBr. Obere Kurve: p-Nitrophenylester-Kupplung, untere Kurve: DCC/HOBt-Kupplung, schwache Bande bei 2250 cm^{-1}.

Diese Bande tritt verstärkt hervor, wenn der DCC/HOBt Kupplungsansatz längere Zeit bei Raumtemperatur gerührt wird. Die weitere Umsetzung zum Tetrapeptidmethylester aus dem mit 1.2 N HCl/Eisessig freigesetzten Tripeptidmethylester gelingt mit Hilfe einer N-Hydroxysuccinimid-Aktivesterkupplung in befriedigenden (59.6 %), respektive mittels der DCC/HOBt-Methode in guten (79.9 %) Ausbeuten. Elementaranalyse, optische Drehung, Aminosäureanalyse und ^{13}C-NMR-Spektroskopie zeigen volle Identität beider Produkte.Eine nitrilhaltige Komponente kann im IR in beiden Fällen nicht mehr gefunden werden.

Zusammenfassend kann somit gesagt werden, daß der Einbau von Asparagin bevorzugt mittels der Aktivestermethode geschehen sollte. Trotz sorgfältig gewählter Kupplungsbedingungen mittels Dicyclohexylcarbodiimid (HOBt-Zusatz, Reaktionstemperatur nicht über 10°C) können Dehydratisierungen nicht ausgeschlossen werden.

Ist Asparagin bereits in das Peptidgerüst inkorporiert, ist auch dann eine Cyanoalaninbildung nicht zu beobachten, wenn der DCC/HOBt-Kupplungsansatz für längere Zeit Raumtemperatur ausgesetzt ist.

3.2.1. Anmerkungen zur Syntheseoptimierung von Boc-Asn-ONp

Da neuere Untersuchungen von Schnabel [80] zeigen, daß selbst bei der Synthese von Boc-Asn-ONp größere Anteile (bis 30 %) an Dehydratisierungsprodukten entstehen, wird versucht, die Darstellung dieses Derivats hinsichtlich der Reinheit und Ausbeute zu optimieren. Mit Hilfe der IR-Spektroskopie und den bekannten Daten der durch Gegenstromverteilung rein erhaltenen [80] Verbindungen Boc-Asn-ONp und Boc-ß-cyanoalanin kann gezeigt werden, daß eine Voraktivierung bei tiefen Temperaturen (-10°C) mit DCC und einer Reaktionstemperatur von $\leq$ 0°C zu keinen nitrilhaltigen Verbindungen führt; läßt man den Reaktionsansatz anschliessend 20 Stunden bei Raumtemperatur, so findet man im Rohprodukt im IR eine Nitrilbande. Durch Kristallisation läßt sich jedoch weitgehend reines Boc-Asn-ONp isolieren. Ein 0.5 molarer Zusatz von HOBt reduziert zwar diese Nitrilbildung, die Aufarbeitung wird dadurch aber deutlich erschwert.

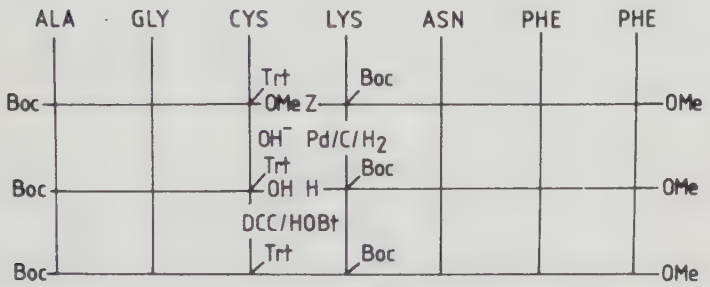
Bei den folgenden Testansätzen wurden DCC und Boc-Asn im molaren Verhältnis, p-Nitrophenol in 20 % Überschuß zugegeben.

Tabelle 1 : Darstellung von Boc-Asn-ONp

Kupplungsbedingungen	Ausbeute %	Fp (°C)	$[\alpha]_D^{20}$ (c=1, DMF)	Bemerkungen
DCC, 1 Std. 0°C, 12 Std. bei 25°C	49	145-148	-35.7	Rohprod.enth. ca. 15 % Nitril
DCC, 1 Std. -10°C, 18 Std. bei 0°C	62.3	153-155	-31.7	sauberste Methode, keine Nitrilbande im IR
DCC/HOBt 1 Std.-10°C 18 Std. 25°C	65.1	149-150	-32.9	Rohprod.enth. ca.5 % Nitril Aufarbeitung aufwendig
Zum Vergleich[80]				
Boc-Asn-ONp:		152-153	-32.2	
Boc(CN)Ala-OH		137-140	-68	

3.3. Synthese des Heptapeptidmethylesters
Boc-Ala-Gly-Cys(Trt)-Lys(Boc)-Asn-Phe-Phe-OMe
(Fragment 1-7)

Die so erhaltenen Fragmente lassen sich nach Verseifen des Fragments 1-3 resp. Hydrierung des N-carbobenzoxygeschützten Tetrapeptids an Pd/C in DMF mittels einer DCC/HOBt-Kupplung zum geschützten Heptapeptidmethylester umsetzen.



Syntheseschema 5: Synthese des Heptapeptidmethylesters Boc-Ala-Gly-Cys(Trt)-Lys(Boc)-Asn-Phe-Phe-OMe

Aufgrund der großen Bedeutung dieses Peptids als Ausgangsverbindung aller weiteren Synthesewege wird das Peptid zusätzlich zur Umkristallisation auf einer LH-20-Säule in Methanol gelchromatographiert.

Auf diese Weise kann das durch Kristallisation schlecht abtrennbare nicht umgesetzte Tetrapeptid sauber abgetrennt werden. Das sehr rein anfallende Heptapeptid wird durch Felddesorptionsmassenspektrometrie, ^{13}C-NMR-Spektroskopie, Aminosäureanalyse und Elementaranalyse charakterisiert. Das Ergebnis des Racemattests zeigt, daß dieser Syntheseweg ohne nennenswerte Racemisierungen verläuft.

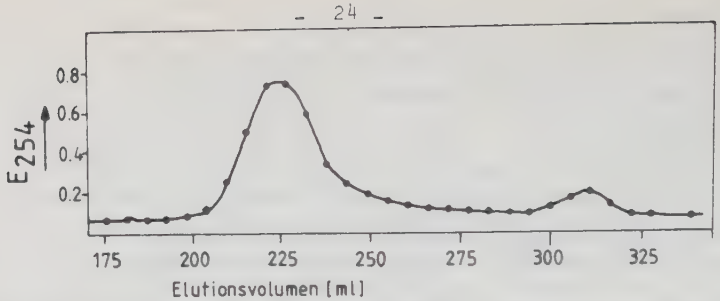


Abb. 10: Gelfiltration des durch Umfällen aufgereinigten Heptapeptids Boc-Ala-Gly-Cys(Trt)-Lys(Boc)-Asn-Phe-Phe-OMe (300 mg) an Sephadex LH 20. Säule 85 x 2.2 cm. Elution mit Methanol. Durchflußrate 25.7 ml/h. V_o: 173 ml. Fraktion I: 225 mg. Fraktion II: 23 mg H-Lys(Boc)-Asn-Phe-Phe-OMe. Detektion bei 254 nm.

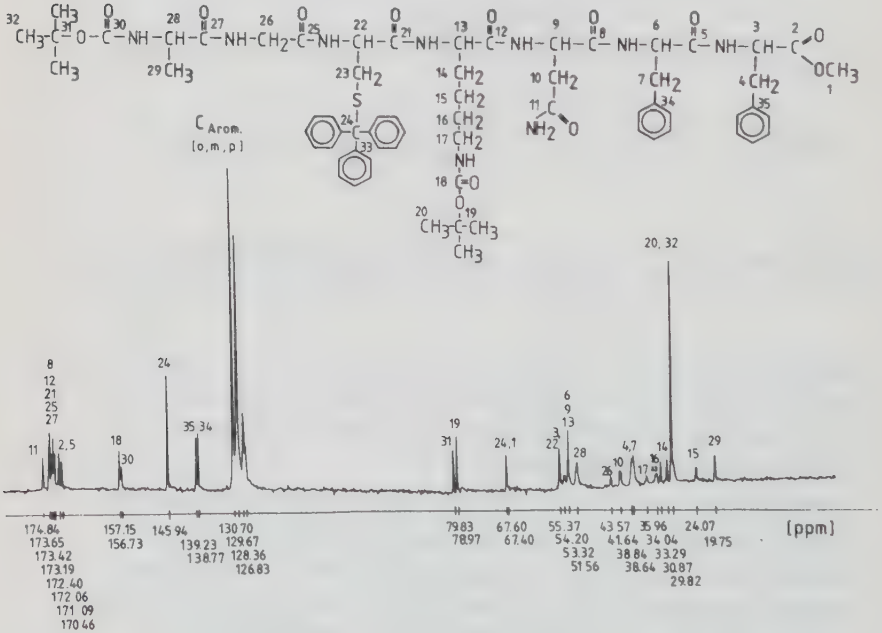


Abb. 11: ^{13}C-NMR-Spektrum von Boc-Ala-Gly-Cys(Trt)-Lys(Boc)-Asn-Phe-Phe-OMe ;protonenbreitbandentkoppelt, 22.63 MHz, 200 mg in 1 ml ^{12}C-DMSO-d_6. 80 000 Pulsinterferogramme.

Das FD-MS-Spektrum des Heptapeptidmethylesters mit den wichtigsten Fragmentierungen ist in Abb.12 dargestellt. Ein Cluster von Peaks ist um den $(M+H)^+$ -Peak zentriert. Als Basispeak erscheint bei m/e 243 der Triphenylmethyl-Ionenpeak, entsprechend findet man bei m/e 1000/1001 die $(M-243, 244)^{\pm}$-Molekülionen. Durch Abspaltung von OCH_3- entsteht daraus das Fragmention m/e 969. Der Verlust von einem Molekül H_2O (Asn) aus dem $(M-100)^+$-Fragmention wird durch die Signale bei m/e 1125 und 1126 angezeigt. Auffällig ist, daß unter den Aufnahmebedingungen nur die N^{α} -Boc-Gruppe, nicht jedoch auch die N^{ε} -Boc-Gruppe abgespalten wird. Dies ist für die Beurteilung von Abspaltungsreaktionen von grosser Bedeutung (s.S. 85).

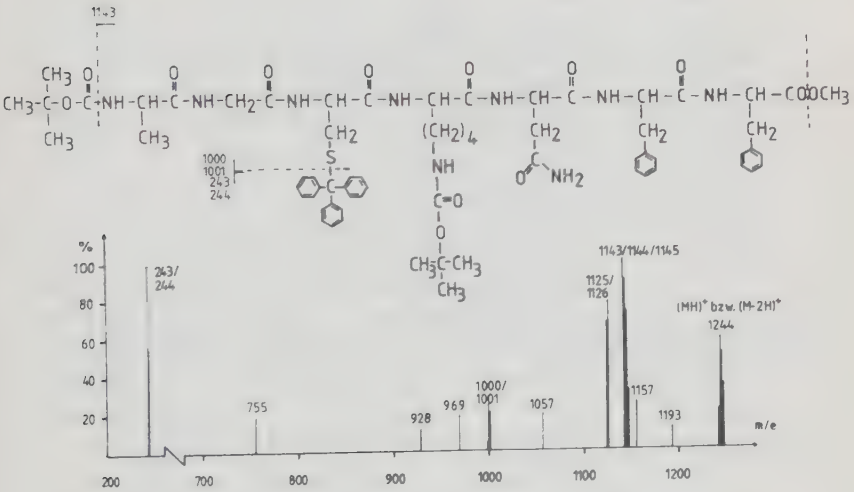
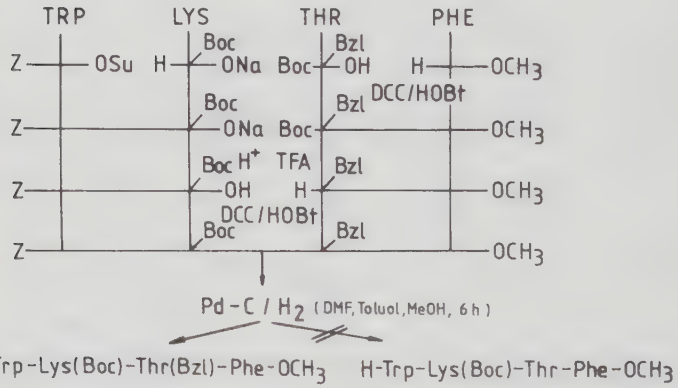


Abb. 12: FD-MS-Spektrum von Boc-Ala-Gly-Cys(Trt)-Lys(Boc)-Asn-Phe-Phe-OCH_3 (Lösungsmittel DMSO, Emitterheizstrom 15 mA).

4. Synthese des Fragments 8-11
Z-Trp-Lys(Boc)-Thr(Bzl)-Phe-OMe

Wie die Reaktionsschemata demonstrieren, sollen der weitere Kettenaufbau durch eine (7+4)+3 Fragmentkondensation erreicht werden. Unter Berücksichtigung der eingangs gestellten Forderungen, wird die ε-Aminogruppe des Lysins mit derselben Schutzgruppe wie in Position 4 maskiert (tert.-Butyloxycarbonyl). Dadurch kann Tryptophan aminoendständig mit der Carbobenzoxygruppe geschützt und somit können Voraussetzungen für eine milde Abspaltung geschaffen werden.



Syntheseschema 6: Synthese von Z- Trp-Lys(Boc)-Thr(Bzl)-Phe-OMe

Da aber auf die gut zugängliche, kristallisationsfreudige Benzylschutzgruppe der Hydroxylfunktion des Threonins nicht verzichtet werden sollte, stellte sich das Problem der Abspaltungsselektivität der N^{α}-Z und O-Benzyl-Gruppe durch katalytische Hydrierung.

Bekannterweise läßt sich die O-Benzylgruppe des Serins durch katalytische Hydrogenolyse entfernen, wobei jedoch Reaktionszeiten von 72 Stunden nicht unüblich sind. Über die Stabilität von O-Benzylthreonin gegenüber katalytisch aktiviertem Wasserstoff ist nur wenig bekannt. Am Beispiel des Tetrapeptids Z-Trp-Lys(Boc)-Thr(Bzl)-Phe-OMe sollte daher untersucht werden, ob eine selektive Abspaltung der N^{α}-Z-Gruppe in Anwesenheit einer O-Benzylthreoninmaskierung möglich ist.

Hierfür werden die ^{1}H-NMR-Spektroskopie und die Dünnschichtchromatographie herangezogen.

4.1. Verfolgung der Abspaltung von Benzylschutzgruppen mittels ^{1}H-NMR-Spektroskopie

Obwohl die ^{1}H-NMR-Spektroskopie für größere Peptideinheiten aufgrund vieler überlappender Multipletts sehr komplizierten Charakter annehmen kann, kann sie bei Anwesenheit von Benzylschutzgruppen vorteilhaft angewandt werden, da die Signale der beiden isochronen Methylenprotonen stets als scharfe Singuletts gerade im signalarmen Gebiet zwischen 4 und 6 ppm auftreten [83]. Die ^{1}H-NMR-Spektroskopie bestätigt den mittels Dünnschichtchromatographie angedeuteten Verlauf. Während im Z-geschützten Tetrapeptid sich die beiden Singuletts (a) und (b) deutlich manifestieren, verschwindet das Singulett der Benzylgruppe (a) nach 6-stündiger Hydrogenolyse mit Pd/C in DMF-Toluol-Methanol 5:3:2, während dasjenige des Benzylethers von Threonin (b) bei 4.4 ppm erhalten bleibt.

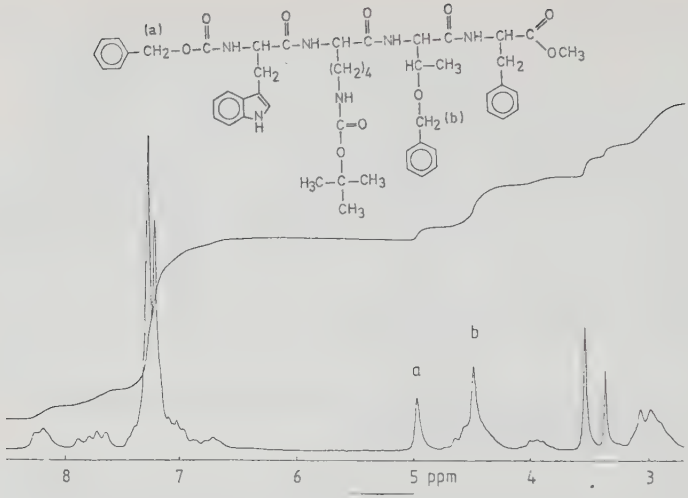


Abb. 13: ^{1}H-NMR-Spektrum (80 MHz, Standard TMS) von Z-Trp-Lys(Boc)-Thr(Bzl)-Phe-OMe in Dimethyl sulfoxid-d_6

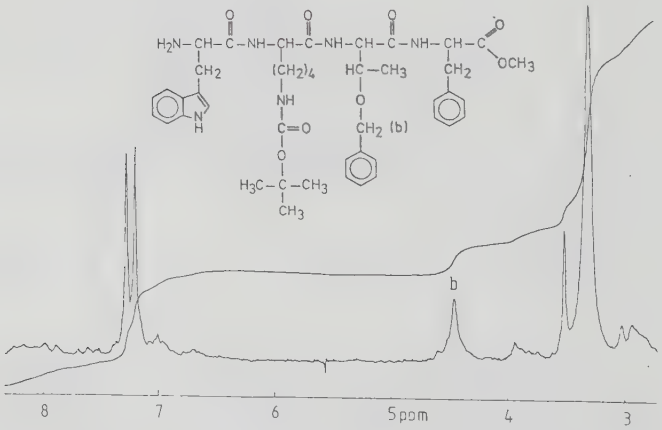


Abb. 14: ^{1}H-NMR-Spektrum (80 MHz, Standard TMS) von H-Trp-Lys(Boc)-Thr(Bzl)-Phe-OMe in Dimethyl-sulfoxid-d_6.

Ergebnis der Dünnschichtchromatographie (% Angaben sind abgeschätzt)

Abspaltung des Z		des Obenzyl-Restes
60 Minuten	60 %	0 %
180 Minuten	90-95 %	0 %
250 Minuten	95 %	$<0{,}5$ %
360 Minuten	98 %	$\approx 0{,}5$ %

Zur Darstellung dieses Peptids wird analog der Sequenz 1-2 der N-Hydroxysuccinimidester des Carbobenzoxytryptophans mit dem freien Na-Salz des N^{ε}-Boc-Lysins umgesetzt, wobei direkt das kondensationsfähige Dipeptid anfällt. Das durch DCC/HOBt Kupplung mit anschließender Acidolyse mit Trifluoressigsäure erhaltene Dipeptid H-Thr(Bzl)-Phe-OMe kann ohne Komplikationen zum geschützten Sequenzanteil 8-11 verlängert werden.

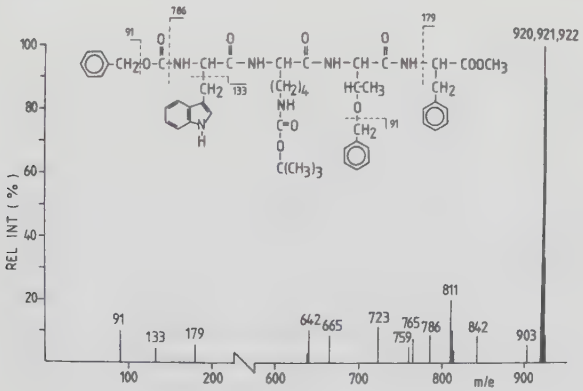
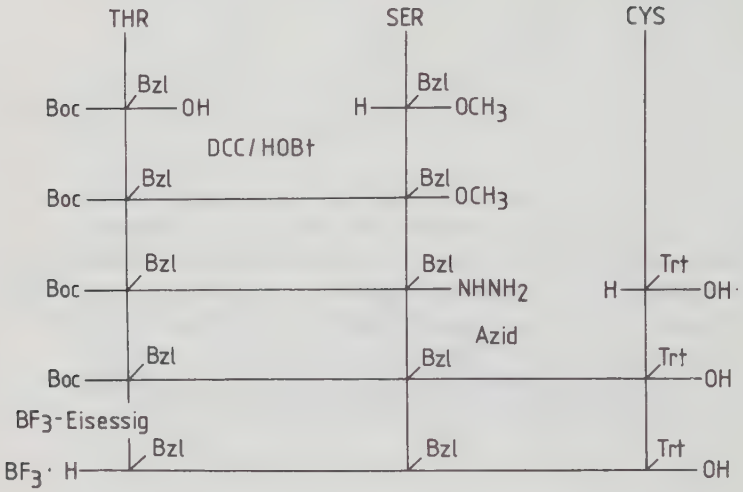


Abb. 15 : FD-Massenspektrum von Z-Trp-Lys(Boc)-Thr(Bzl)-Phe-OMe.(Lösungsmittel DMSO, Emitterstromheizung 15 mA). In der Abb. nicht angegebene Ionensignale können folgendermaßen interpretiert werden: m/e = 903 : $[MH-H_2O]^+$; m/e = 842 : $[M-C_6H_6]^+$; m/e = 642 : [Z-Trp-Lys-Thr(Bzl)-C $\equiv$O$]^+$.

5. Synthese des Fragments 12-14
H-Thr(Bzl)-Ser(Bzl)-Cys(Trt)-OH



Syntheseschema 7: Synthese von H-Thr(Bzl)-Ser(Bzl)-Cys(Trt)-OH

Die Darstellung des C-terminalen Tripeptids gemäß Schema 7 gelingt unter Zuhilfenahme konventioneller Kupplungstechniken und bereitet kaum Schwierigkeiten. Um Verseifungsschritte zu vermeiden, wird der geschützte Dipeptidmethylester Boc-Thr(Bzl)-Ser(Bzl)-OCH_3 in das gut kristallisierende Hydrazid überführt. Durch eine Azidkupplung nach Honzl-Rudinger [85] wird das Triethylamoniumsalz des S-Tritylcysteins direkt zum carboxylfreien, N-geschützten Tripeptid Boc-Thr(Bzl)-Ser(Bzl)-Cys(Trt)-OH umgesetzt. Diese Kupplungsstrategie führt zu einem Tripeptid mit sehr hoher Reinheit (s. ^{13}C-NMR-Spektrum in Abb. 17).

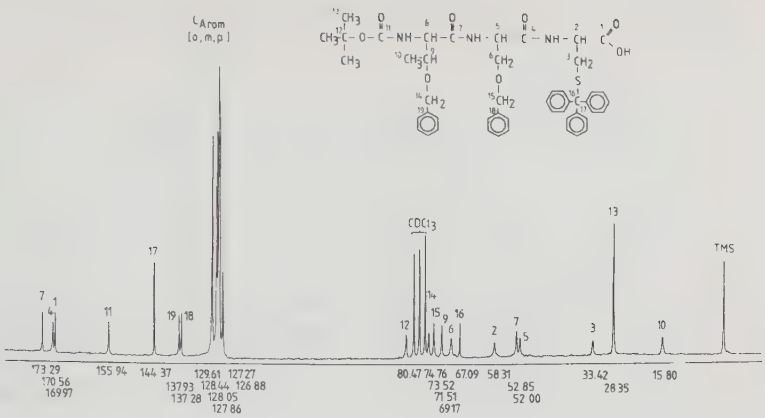


Abb. 17: ^{13}C-NMR-Spektrum von Boc-Thr(Bzl)-Ser(Bzl)-Cys(Trt)-OH; protonenbreitbandentkoppelt, 22,63 MHz, 200 mg in 1 ml $CDCl_3$, 138 000 Pulsinterferogramme.

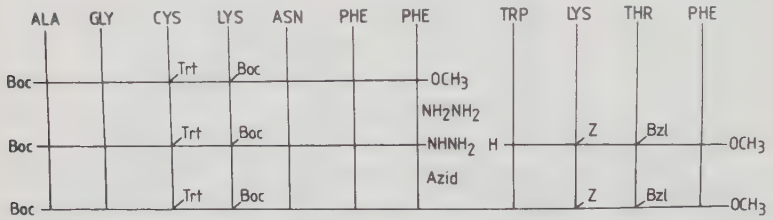
Problematisch scheint lediglich die Deblockierung der aminoendständigen Boc-Gruppe in Anwesenheit der ebenfalls säurelabilen S-Tritylgruppierung. Durch die Verwendung von Bortrifluoretherat in Eisessig [84] als Spaltungsreagens kann in guten Ausbeuten das gewünschte Tripeptid $BF_3.NH_2$-Thr(Bzl)-Ser-(Bzl)-Cys(Trt)-OH erhalten werden. Die Verbindung zeigt keine Reaktion auf freie SH-Gruppen mittels Ellman-Reagens[132].

Da trotz einheitlichem Verhalten auf dem Dünnschichtchromatogramm die Elementaranalyse nach Trocknen über KOH im Hochvakuum unbefriedigend ist (ber. 7.12 % F, gef. 4.71 % F) werden 100 mg der Substanz auf LH 20 gelchromatographiert (Methanol als Eluens). Das Elutionsdiagramm (Detektion bei 254 nm) zeigt zwei Fraktionen, die gleichen Rf-Wert im Dünnschichtchromatogramm geben. Aufgrund der Elementaranalyse handelt es sich bei Fraktion 1 um das Bortrifluoretherat (Gef. 7.76 % F, Fp. 116°C unter Zers., 56 mg) und bei Fraktion 2 um das freie Amin (Gef. 0 % F, Fp. 148°C unter Zerfl.bei 175° Zers.,42 mg).

6. Synthese des Fragments 1-11

Boc-Ala-Gly-Cys(Trt)-Lys(Boc)-Asn-Phe-Phe-Trp-Lys(Boc)-Thr(Bzl)-Phe-OMe

Das durch Hydrazinolyse des Heptapeptidmethylesters in über 90 % Ausbeute erhaltene Hydrazid wird durch eine Azidkupplung nach Honzl-Rudinger [85] zum Undecapeptid verlängert.



Syntheseschema 8: Synthese des Undecapeptidmethylesters Boc-Ala-Gly-Cys(Trt)-Lys(Boc)-Asn-Phe-Phe-Trp-Lys(Boc)-Thr(Bzl)-Phe-OMe

Wie der Hydrazidtest zeigt, ist die Bildung des Azids (in Dimethylformamid mit Hilfe einer 1.8 N HCl-Lösung in Tetrahydrufuran und Isoamylnitrit bei -30°C hergestellt) nach 20 Minuten beendet. Die Aufreinigung von 250 mg Kupplungsprodukt an LH 20 in Methanol ergibt 3 Fraktionen, welche durch Aminosäurenanalyse und Dünnschichtchromatographie untersucht werden. Neben der Hauptfraktion (160 mg) werden geringe Mengen an Heptapeptid (Fraktion 2,22 mg) und Aminokomponente (Fraktion 3, 3.8 mg) erhalten. Die Gesamtausbeute beträgt über 80 %. Als hervorragende analytische Methode zur Identitätsfindung des Undecapeptidmethylesters erweist sich neben der korrekten Aminosäurenanalyse die Felddesorptions-Massenspektrometrie, die trotz des hohen Molekulargewichts von 1995 und der sehr geringen Flüchtigkeit ein gut interpretierbares Spektrum mit einem deutlich erkennbaren Molekülpeak liefert:

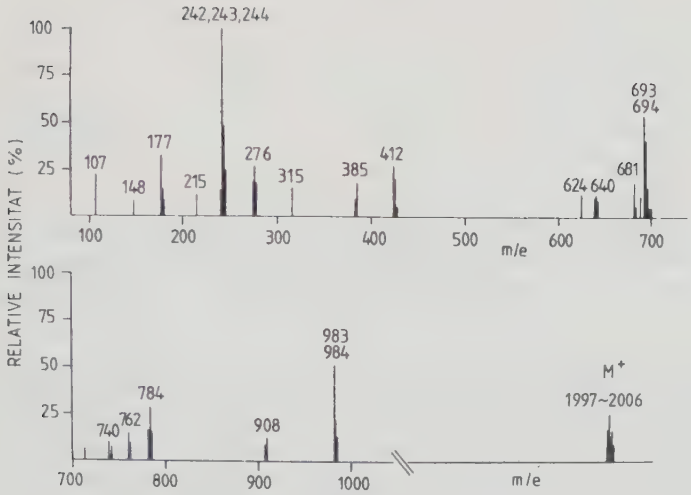


Abb. 18: FD-MS-Spektrum von Boc-Ala-Gly-Cys(Trt)-Lys(Boc)-Asn-Phe-Phe-Trp-Lys(Boc)-Thr(Bzl)-Phe-OCH_3 (Lösungsmittel DMSO, Emitterheizstrom 23 mA).

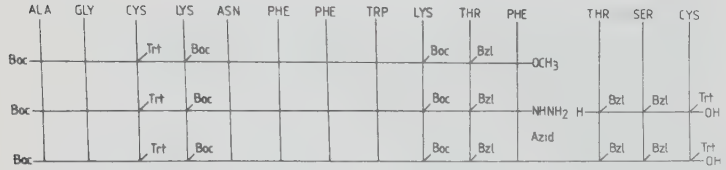
Herausragende Signale des Spektrums sind die Ionen bei m/e = 242, 243, welche durch die Abspaltung der S-Trityl-Gruppe entstanden sind (s. Abb. 3). Der Bindungsbruch in der Mitte des Moleküls führt zu zwei sequenzspezifischen Fragmenten, die durch die Signale m/e = 983: [Boc-Ala-Gly-Cys-Lys(Boc)-Asn-Phe-Phe-C=O]$^+$ und m/e = 784: [Trp-Lys(Boc)-Thr(Bzl)-Phe-OMe]$^+$ bzw. m/e = 693: [Trp-Lys(Boc)-Thr-Phe-OMe]$^+$ repräsentiert werden.

Weitere Ionensignale können wie folgt interpretiert werden:

m/e	
107	$[Ph\text{-}CH_2\text{-}O]^+$
148	$[H_3N\text{-}Lys\text{-}OH.H]^+$
242	$[^+C(Ph)_3]^+$
243	$[HC(Ph)_3]^+$
244	$[HC(Ph)_3.H]^+$
276	$[Thr\text{-}Phe\text{-}OCH_3]^+$
315	$[Trp\text{-}Lys\ C{\equiv}O]^+$
413	$[H_3N\text{-}Asn\text{-}Phe\text{-}Phe\ C{\equiv}O]^+$
693	$[Trp\text{-}Lys(Boc)\text{-}Thr\text{-}Phe\text{-}OCH_3]^+$
784	$[Trp\text{-}Lys(Boc)\text{-}Thr(Bzl)\text{-}Phe\text{-}OCH_3]^+$
983	$[Boc\text{-}Ala\text{-}Gly\text{-}Cys\text{-}Lys(Boc)\text{-}Asn\text{-}Phe\text{-}Phe\text{-}C{\equiv}O]^+$

7. Ergebnisse der Versuche zur Bildung des geschützten Somatostatins nach dem Syntheseweg 1

Nach der sehr gut verlaufenden Azidkupplung zum Undecapeptid läßt die weitere Kettenverlängerung zum geschützten Somatostatin nach Syntheseschema 9 keine Schwierigkeiten erwarten.



Syntheseschema 9: Synthese des geschützten Somatostatins durch eine 11 + 3 Fragmentkondensation (Weg 1).

Die mit einer Azidkupplung durchgeführte Verknüpfung des Undecapeptidhydrazids mit dem durch Triethylamin freige-

setzten, C-terminalen,Tripeptid ergibt trotz Variation der Reaktionsbedingungen keinerlei Hinweis auf eine erfolgte Kupplung.

Ergebnis der Aminosäurenanalyse (6 N HCl, 115°C, 18 h)

	Ala	Gly	Cys	Asp	Lys	Phe	Thr	Ser	NH_3
Ber:	1	1	2	1	2	3	2	1	1
Gef:	1.02	1.0	0.75	1.04	2.0	3.04	0.96	0	1.8
Undecapeptidhydrazid (1-11)	1.09	1.0	0.69	1.09	2.10	3.08	0.92		1.27.

Die Gelchromatographie auf LH 20, die aufgrund der verminderten Löslichkeit des Reaktionsproduktes in Methanol auf einer thermostatisierten Säule (35°C) durchgeführt wird, zeigt im wesentlichen 2 Fraktionen, wovon in Fraktion 2 (bei 3 V_o) die Aminkomponente fast quantitativ wiedergefunden wird. Fraktion 1 (1.4 V_o) wird mittels der Aminosäurenanalyse und der Elementaranalyse untersucht. Das Ergebnis der Aminosäurenanalyse zeigt deutlich das Fehlen von Serin (0 %) und dem zweiten Threoninmolekül an. Eine Kupplung findet nicht statt.

Hilfestellung zur Klärung der Struktur von Fraktion 1 ergibt die Elementaranalyse.

	C	H	N	S (% Angaben)
Undecapeptidhydrazid	64.41	6.82	11.93	1.6o
gesch.Somatostatin	66.84	6.58	9.35	2.37
Undecapeptidamid	64.96	6.83	11.31	1.62
Gefunden	63.96	6.83	11.36	1.90

7.1. Nebenreaktionen bei Azid-Kupplungen

Als mögliche Nebenreaktionen der Azidkupplung kommen in Betracht:

a) keine Umsetzung zum Azid, Rückgewinnung von nichtumgesetztem Undecapeptidhydrazid,
b) Umlagerung des Azids in Isocyanate (Curtius-Abbau); diese Reaktion kommt nicht in Betracht, da das Amin fast vollständig wiedergewonnen werden kann und
c) Umlagerung des gebildeten Azids zum Amid.

Im Rahmen einer Peptidsynthese beschreiben Zahn [86] und Wünsch [87] Kupplungen nach der Azid-Methode, bei welchen entweder fast quantitativ unverändertes Hydrazid wiedergefunden wird, oder bei denen eine Umlagerung zum Säureamid stattfindet.

Da der Hydrazidtest unter den gewählten Kupplungsbedingungen (2.8 N HCl in THF; Isoamylnitrit bei -25°C in DMF-DMSO) zwar positiv, aber deutlich schwächer ist, liegt die Vermutung für eine Amidbildung nahe. Dafür spricht vor allem der deutlich über dem Blindwert für das Hydrazid liegende NH_3-Wert aus der Aminosäurenanalyse. Die sehr hohen und sehr eng beeinander liegenden Molekulargewichte (1995 und 1996 für das Amid) verhindern exakte Aussagen aus FD-MS-Daten.

Die Nebenreaktion zum Amid kann durch hohe Nitrit- und Protonenkonzentrationen [85] zurückgedrängt werden. Die leichte Nitrosierungsbereitschaft des Tryptophans und die säurelabilen Schutzgruppen setzen diesen Alternativen enge Grenzen.

7.2. Azidkupplungen bei verschiedenen Reaktionsbedingungen

Die Ergebnisse alternativer Aktivierungsbedingungen sind in Tabelle 2 kurz skizziert.
Da bei der Verwendung von Nitrosylchlorid als Nitrosierungsreagens [85, 138] kein Säurezusatz erforderlich ist, wird auch diese Methode erprobt.

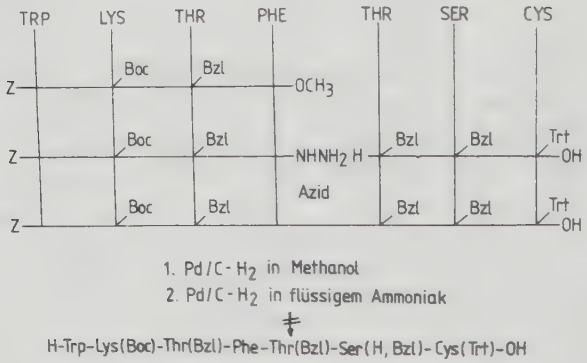
Tabelle 2 : Verschiedene Aktivierungsbedingungen zur Herstellung des geschützten Somatostatins, ausgehend vom Undecapeptidhydrazid.

Nitrosierungs-Medium in DMF-DMSO 7:3	Isoamylnitrit Äquivalente	Temp. (° C)	Ergebnis
14/1 : 2.6 N HCl-THF, 4 Äquivalente	5	-30	kein Umsatz, farbloses Reaktionsgemisch. Hydrazid-Amid-Gemisch.
14/2 : 2.6 N HCl-THF, 10 Äquivalente	3	-30	Ausgangsprod. zu 50% verschwunden, jedoch starke gelb-orange-Verfärbung (Nitrosotryptophan? S-Detritylierung?).
14/3 : 2.6 N HCl-THF, 4 Äquivalente	5	-15	gelb-orange Verfärbung des R$_f$-Ansatzes. Wenig Ausgangsprodukt, jedoch keine Kupplung.
14/4 : 1.1 Äquivalente NOCl (1.8 N in Ether)	-	-25°C	Auftreten eines neuen Produkts zu etwa 20 %. Produkt schwach rosa.

Obwohl bei der Verwendung von Nitrosylchlorid eine partielle Umsetzung gefunden wird, sind die Ergebnisse insgesamt enttäuschend. Weitere Variation der Reaktionsbedingungen lassen keine entscheidenden Optimierungen erhoffen. Nach Geiger ist in stärker saurem Milieu (z.B. Kupplungsansatz 14/2) in jedem Fall mit Nitrosierungen aromatischer Aminosäuren und S-Detritylierungsreaktionen zu rechnen [88].

7.3. Alternative Synthesen des Heptapeptids 8-14

Da mit den Fragmenten 8-11 und 12-14 kupplungsfähige Synthesevorstufen vorliegen, wird als Synthesekonzept eine 7 + 7 Fragmentkondensation angestrebt. Die Azidkupplung des Tetrapeptidhydrazids 8-11 mit H-Thr(Bzl)-Ser(Bzl)-Cys(Trt)-OH.Et_3N gelingt in überraschend guten Ausbeuten.



Syntheseschema 10: Synthesevorschlag zur Darstellung von H-Trp-Lys(Boc)-Thr(Bzl)-Phe-Thr(Bzl)-Ser(H,Bzl)-Cys(Trt)-OH.

Die hydrogenolytische Abspaltung der N-Carbobenzoxygruppe des Tryptophans in Anwesenheit des in Position 14 stehenden Cysteinmoleküls erweist sich jedoch als undurchführbar. Sowohl die von Jung und Brückner [89, 144] bei penicillinhaltigen Verbindungen erfolgreich verlaufende Abspaltung der Z-Gruppe nach kontinuierlichem Zutropfen stetig neuer Katalysatorlösung (100 Gew. % Katalysator) über 3 Tage, als auch die kürzlich von Meyenhofer beschriebene Abspaltung von Z-Gruppen in Anwesenheit von Thioverbindungen durch katalytische Hydrierung in flüssigem Ammoniak [90] führt zu keinem Erfolg.

Durch Zusatz von Basen (Cyclohexylamin, NaOH) soll die Desacylierbarkeit gesteigert werden. Frühere Untersuchungen bei methioninhaltigen Peptiden lieferten jedoch nur unbefriedigende Ergebnisse [70]. Nach Losse läßt sich eine Hydrierung unter energischen Bedingungen, d.h.bei einer Hydrierzeit von 10 Tagen bei 60°C und wiederholtem Zusatz von frischem Pd/C-Katalysator erreichen, wenn gleichzeitig 10 Äquivalente BF_3-Etherat vorhanden sind [91]. Diese Methode scheidet aus, da unter solchen Bedingungen die gewählten Schutzgruppen nicht stabil sind.

Erfolge in der Hydrierung schwefelhaltiger Peptide verspricht die jüngst erschienene Arbeit, welche die Abspaltung hydrierbarer Gruppen durch katalytische Transferhydrolyse mit 1,4 Cyclohexadien beschreibt. Die Ausbeute bei cysteinhaltigen Peptiden ist jedoch auch dann gering [92].

7.4. Überlegungen zu einer verbesserten Somatostatinsynthese

Um dem gewünschten Ziel, Wege zu einer ökonomisch sinnvollen und schonenden Somatostatinsynthese zu finden, möglichst nahe zu kommen, muß nach neuen Synthesewegen gesucht werden.

Im folgenden sollen zwei Synthesen beschrieben werden, die zum cyclischen Somatostatin führen.

Bei einer angestrebten 7 + 7 Fragmentkondensation muß dabei der Schutzgruppe des in Position 8 stehenden Tryptophans besondere Beachtung geschenkt werden.

Zielsetzung ist es, eine Schutzgruppe zu finden, die eine milde, selektive Abspaltung in Anwesenheit säurelabiler Schutzgruppen der trifunktionellen Aminosäuren Threonin, Serin und Cystein erlaubt.

Die Bpoc-Gruppe würde diesen Forderungen Rechnung tragen. Trotz verschiedener Synthesewege gelingt es nicht, Bpoc-Tryptophan genügend rein und in akzeptablen Ausbeuten herzustellen. Diese Ergebnisse wurden von Rittel und Sieber bestätigt [96].

Alternativ kann eine eigene, neue säurelabile Schutzgruppe entwickelt werden, die eine um den Faktor 10^3 schnellere Abspaltung als die der Boc-Gruppe erlaubt [39-42]. Die Darstellung des N-Acyltryptophanderivats gelingt in hohen Ausbeuten. Im folgenden Kapitel werden Synthesewege und Eigenschaften dieser neuen Schutzgruppe beschrieben.

IV. ENTWICKLUNG VON NEUEN, SÄURELABILEN SCHUTZGRUPPEN

1. Bekannte, säurelabile Aminoschutzgruppen

Obwohl die bekannten Aminoschutzgruppen vom Urethantyp (tert.-Butyl- und Benzyloxycarbonyl) viele Anforderungen von eindeutig verlaufenden Peptidsynthesen erfüllen, ist es oft wünschenswert, Aminoschutzgruppen unter sehr milden acidolytischen Bedingungen freizusetzen, da dadurch eine optimale Schonung säurelabiler Reste bei Synthesen mit repetitiven Kupplungs- und Deblockierungsschritten (Festphasen- und Liquidphasenmethode) erreicht wird. Tryptophanhaltige Peptide erfahren bei Desacylierungen in stärker saurem Milieu oft eine Zerstörung des Indolsystems, was sich in einer Violettverfärbung und UV-Absorptionsverschiebung äussert. Diese Nebenreaktionen können bei Verwendung milder Deblockierungsreagenzien auf ein Minimum reduziert werden. Die vor kurzer Zeit entwickelten Schutzgruppen Bpoc [17], Ddz [98], Ppoc [99] und Azoc [100] tragen diesen Forderungen Rechnung, jedoch konnten nur die ersten beiden breitere Anwendung finden. In beiden Fällen scheint die Lagerung der geschützten Aminosäuren aus Gründen autokatalytischer Zersetzung bzw. Photolabilität nicht ganz unproblematisch. Auch das zur Einführung oft benutzte Bpoc-phenylcarbonat neigt selbst bei tiefen Temperaturen zur Zersetzung.

Eine Darstellung von Bpoc-Trp-OH gelingt nach eigenen Erfahrungen sowohl über das Bpoc-Phenylcarbonat als auch über das Bpoc-Fluorid nur in geringen Ausbeuten. Diese Angaben wurden von Rittel und Sieber bestätigt [96].

2. Zielsetzung

Ziel der weiteren Untersuchungen war daher die Entwicklung einer Aminoschutzgruppe, welche einen schonenden Aufbau des Heptapeptids X-Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-Ser-Cys-OH erlaubt. Gleichzeitig sollte diese Schutzgruppe unter Bedingungen abspaltbar sein, welche sowohl das Indolsystem des Tryptophans, als auch die an trifunktionellen Aminosäuren ge-

bundenen Schutzgruppen unversehrt läßt.

Syntheseendziel sollte schließlich sein, diese Peptidsequenz unter Verwendung der relativ mild abspaltbaren tert.-Butylschutzgruppe für die Hydroxylfunktionen des Threonins und Serins und der ε-Aminogruppe des Lysins zu synthetisieren.

Aminoschutzgruppen, die als Urethane in Aminosäuren eingeführt werden, zeichnen sich durch geringe sterische Hinderung und durch geringe Racemisierungstendenz bei Peptidsynthesen aus. Vom synthetischen Standpunkt war daher eine Aminoschutzgruppe vom Urethantyp erwünscht, die unter sehr milden Bedingungen abspaltbar ist.

Damit würde es möglich, das geschützte Tetradecapeptid unter ausschließlicher Verwendung säurelabiler Schutzgruppen zu synthetisieren und somit die Deblockierungsendstufe, welche maßgeblich mitbestimmend für die Ausbeute, Homogenität und biologischer Aktivität ist, schonend zu gestalten. Auf eine HF-Hydrolyse könnte somit verzichtet werden.

3. Theoretische Vorüberlegungen zur Synthese säurelabiler Schutzgruppen vom Urethantyp

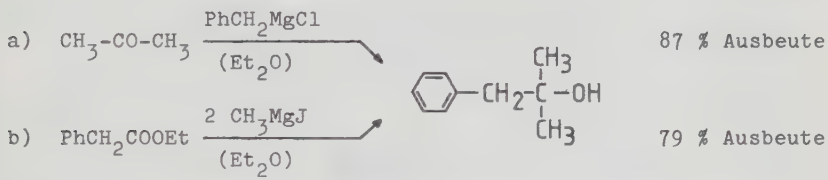
Bekanntlich erfolgt die Solvolyse von Alkylhalogeniden R-X umso rascher, je stabiler das entsprechende Carbeniumion $R^{\oplus}$ ist. Über die Beeinflussung der sauren Hydrolyse in Urethanen vom Typ R-O-CO-NH- durch die Konstitution des Restes R ist bislang nur wenig bekannt. Unter der Annahme, daß die acidolytische Spaltung als monomolekulare Reaktion unter Alkyl-Sauerstoff-Spaltung ($A_{AL}1$) erfolgt und vielleicht durch die Konstitution der Alkylgruppe R in ähnlicher Weise beeinflußt werden könnte wie die Solvolyse von Alkylhalogeniden R-X, wird im folgenden untersucht, in bekannte Schutzgruppen des Urethantyps eine α,α-Dimethylgruppe einzuführen und die acidolytische Spaltbarkeit zu testen.

4. Die 1-Benzyl-1-methylethoxycarbonylgruppe (Bzpoc) +)

Führt man zwischen der Oxycarbonylgruppe und der Benzylgruppe des bekannten Z-Restes eine Isopropylgruppe ein, so gelangt man zu der interessanten Beobachtung, daß die neue Gruppe eine um den Faktor 1000 höhere Spaltbarkeit im sauren Milieu aufweist. Somit zeigt die Bzpoc-Gruppe Abspaltungseigenschaften, die der Boc-Gruppe entsprechen. Im Gegensatz zur Boc-Gruppe ist die neue Bzpoc-Gruppe auch hydrogenolytisch abspaltbar.

4.1. Darstellung von Bzpoc-Aminosäuren

Zur Darstellung dieser Aminomaskierung geht man vom 2-Benzylpropanol (2) aus, welches auf 2 Wegen leicht erhalten wird.

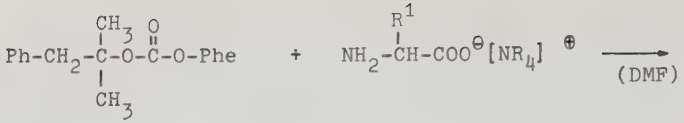


Der tertiäre Alkohol läßt sich durch Destillation (Kp_{10} 104-105°C, n_D^{22} : 1.5170) reinigen. Das farblose Öl kristallisiert im Kühlschrank in langen Nadeln (Fp. 24°C).

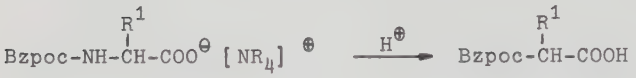
Das durch weitere Umsetzung mit Chlorameisensäurephenylester erhaltene Benzylisopropyl-phenylcarbonat (Bzpoc-OPh) stellt ein reaktives, kristallines Einführungsreagens dar.

Zur Acylierung werden die Benzyltrimethylammoniumsalze der Aminosäuren (2) in absolutem Dimethylformamid mit dem gemischten Carbonat (1) umgesetzt:

+) auch als 2-Benzyl-propyl(2)-oxycarbonyl- oder α,α -Dimethyl(-ß-phenylethyl)oxycarbonyl- zu bezeichnen.



(1) (2)



In nachfolgender Tabelle werden die physikalischen Daten von drei Aminosäurederivaten angegeben:

Tabelle 1:

Aminosäure-derivat	Ausbeute %	Fp.[°C]	$[\alpha]_D^{23}$	Rf_D
Bzpoc-Gly-OH	72	110		o.45
Bzpoc-Ala. DCHA	82	129-12o	-1.5° (c=1,6, MeOH)	o.57
Bzpoc-Phe. DCHA	55	126	+18.52° (c=o,8, MeOH)	o.65

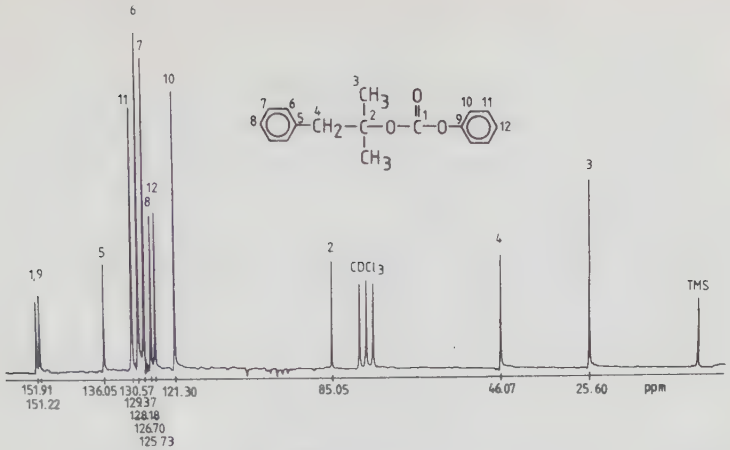


Abb. 19 : ^{13}C-NMR von Benzylisopropyl-phenylcarbonat ; protonenbreitbandentkoppelt, 20.115 MHz, 200 mg in 1 ml $CDCl_3$, 15450 Pulsinterferogramme.

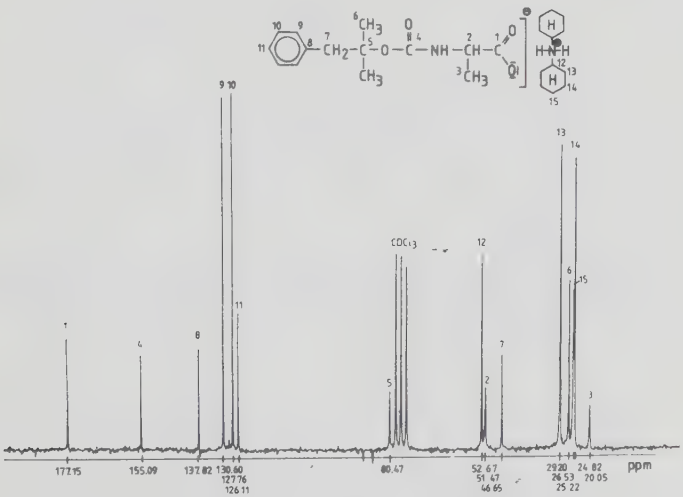


Abb. 20 : ^{13}C-NMR von Bzpoc-Ala·DCHA ; protonenbreitbandentkoppelt, 20.115 MHz, 220 mg in 1 ml $CDCl_3$, 17342 Pulsinterferogramme.

4.2. Abspaltung der Bzpoc-Aminoschutzgruppe

Die Abspaltung der N^{α} -Bzpoc-Schutzgruppe erfolgt je nach Art des sauren Reaktionsmediums innerhalb 5 - 500 Minuten.

In einem Trifluoressigsäure-Methylenchlorid 1:1 (v/v)-Gemisch wird die Bzpoc-Gruppe innerhalb 4-5 Minuten vollständig abgespalten.

Soll die Abspaltung schnell, jedoch unter kontrollierbaren Bedingungen verlaufen, kann 85 % (g/g) Ameisensäure als Spaltreagenz eingesetzt werden.

Tabelle 3: Spaltgeschwindigkeiten von Bzpoc-und Boc-Aminosäuren in 85% (g/g) Ameisensäure

Aminosäure-derivat	50%ige Spaltung (Min)	99%ige Spaltung (Min)	$K_1(Min^{-1})$	Rel.Geschw. (Boc=1)
Bzpoc-Phe-OH	64	426	$1.08.1o^{-2}$	0.5
Bzpoc-Gly-OH	52	346	$1.33.1o^{-2}$	0.6
Boc-Phe-OH	31.5	209	$2.2\ .1o^{-2}$	1

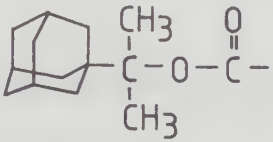
Die Bzpoc-Gruppe ist im Gegensatz zur Boc-Gruppe auch durch katalytische Hydrierung abspaltbar. Die Reaktionszeit in Tetrahydronfuran/Wasser (80:20) beträgt bei einem pH von 4.5 etwa 60 Minuten.

Die Bzpoc-Gruppe vereinigt somit die Eigenschaften der Boc-Gruppe (etwa doppelte Stabilität in saurem Milieu) und der Z-Gruppe (Abspaltung durch katalytische Hydrierung).

5. Die 1-(1-Adamantyl)-1-methylethoxycarbonyl (Adpoc)-Gruppe

Die von Haas et al. [101] beschriebene Adamantyl(1)-oxycarbonyl (ADOC)-Gruppe hat besonders wegen ihres lösungsvermittelnden Charakters Eingang in die Peptidchemie gefunden; ihre Anwendung blieb jedoch aufgrund ähnlicher Abspaltungseigenschaften wie die der Boc-Gruppe auf wenige Beispiele beschränkt. Die voranstehenden Ergebnisse lassen vermuten, daß die Einführung einer α,α-Dimethylgruppierung zu einer erheblichen Steigerung der Säurelabilität führt. Tatsächlich gelingt es auf diese Weise, die Empfindlichkeit im sauren Milieu um den Faktor 10^3 zu steigern.

Die so erhaltene



1-(1-Adamantyl)-1-methylethoxycarbonyl (Adpoc-)-Gruppe besitzt folgende Eigenschaften:

1. Die Einführung der Schutzgruppe gelingt mit Hilfe stabiler, kristalliner und reaktiver Verbindungen, wie dem Phenylcarbonat (Adpoc-OPh), dem Oximinophenylacetonitril (Adpoc-ON) oder dem Fluorameisensäureester (Adpoc-F) (s.Abb. 23).

2. Die Aufhebung der N-[2-Adamantan-(1)-isopropyl]-Maskierung gelingt im milden acidolytischen Medium, vorzugsweise 3 % Trifluoressigsäure in Methylenchlorid innerhalb 4-5 Minuten bei 0°C oder innerhalb 1-2 Minuten bei Raumtemperatur. Mittels eines Essigsäure/83%-Ameisensäure/Wasser (7:1:2)-Gemisches gelingt die Abspaltung innerhalb 100 Minuten (40°C). Hierbei wird eine weitestgehende Demaskierungsselektivität gegenüber Schutzgruppen vom tert.-Butyltyp erreicht. Selbstverständlich bleiben auch N-Benzyloxycarbonyl-, O-Benzylether- sowie Estergruppierungen unangetastet.

3. Die Schutzgruppe ist sowohl gegen Alkali als auch gegenüber Hydrogenolyse vollkommen stabil.
4. Aufgrund der ausgeprägten Lipophilie besitzt der Adpoc-Rest insbesondere bei höheren Peptiden stark lösungsvermittelnde Eigenschaften.
5. Adpoc-Trp-OH ist in hohen Ausbeuten darstellbar. Die Lagerung dieser Verbindung bei normalen Lichtverhältnissen und bei Raumtemperatur führt führt nach 3 Monaten zu keiner Veränderung des Derivates.
6. Die in der Peptidchemie üblichen Methoden (DCCI/HOBt-Kupplungen, Aktivesterkupplungen, Verseifungen, Hydrierungen, Hydrazinolysen) können unter Erhaltung des Adpoc-Restes angewandt werden.

5.1. Synthese der Ausgangsverbindungen und Einführungsreagenzien

Erstes Ziel zur Darstellung der Adpoc-Gruppe ist die Herstellung des entsprechenden Carbinols. Aus der relativ günstig zugänglichen 1-Adamantancarbonsäure wird mit Phosphorpentachlorid/Ethanol in hohen Ausbeuten der Ethylester erhalten, welcher mit Grignard-Reagenz (aus Methyljodid und Magnesium) zum tertiären Alkohol 2-(1-Adamantyl)-2-propanol umgesetzt wird. Die Ausbeute beträgt über beide Stufen über 90 %.

Eine direkte Umsetzung von 1-Bromadamantan mit Magnesium führt zu keinem Erfolg und bestätigt die von Stetter et al. gemachten Erfahrungen [102].

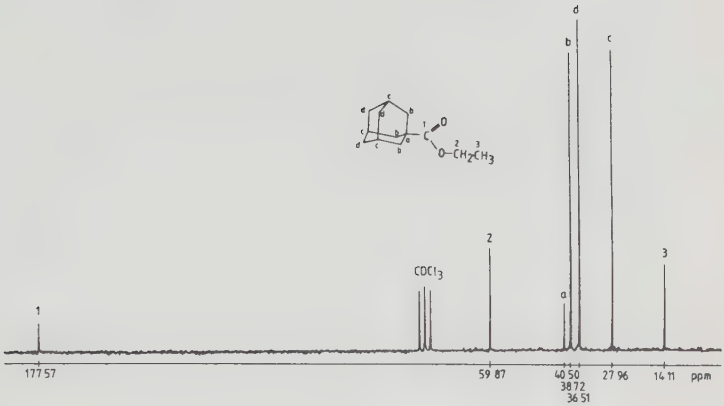


Abb.21: ^{13}C-NMR von 1-Adamantancarbonsäure-ethylester ; protonenbreitbandentkoppelt, 22,63 MHz, 25o mg in 1,5 ml $CDCl_3$, 1445o Pulsinterferogramme .

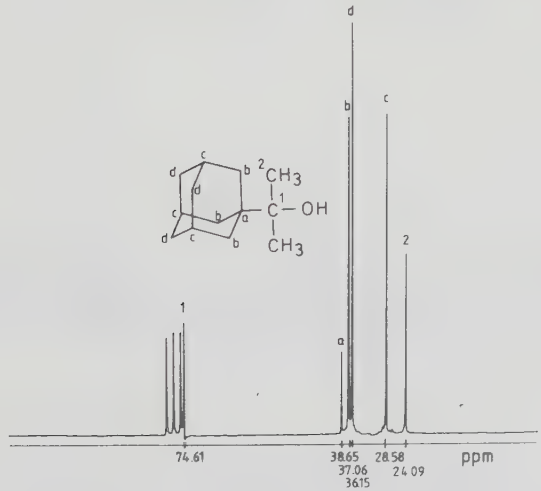


Abb.22: ^{13}C-NMR von 2-(1-Adamantyl)-2-propanol ; protonenbreitbandentkoppelt, 22.63 MHz, 2oo mg in 1 ml $CDCl_3$, 1137o Pulsinterferogramme .

Erwartungsgemäß führt die Umsetzung mit Phosgen zu einem wenig stabilen Chlorameisensäureester (Zersetzung bei Temperaturen $> -40^{\circ}C$); auch die Umsetzung des Alkohols mit Chlorameisensäure-N-hydroxysuccinimidester (hergestellt nach Zitat 126) zum gemischten Carbonat Ad-$C(CH_3)_2$-O-CO-OSu kann wegen der geringen Ausbeuten nicht befriedigen.

Alternativ werden daher folgende stabile und reaktive Einführungsreagenzien hergestellt.

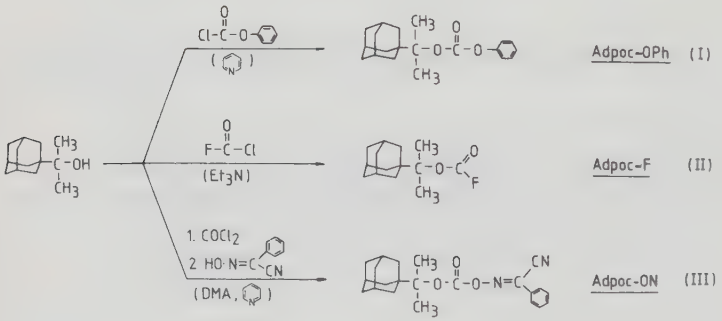


Abb. 23 : Darstellung von Adpoc-Einführungsreagenzien

Zur Einführung der Adpoc-Gruppe werden die Benzyltrimethylammonium (Triton B-)salze der Aminosäuren in absolutem Dimethylformamid mit den Reagenzien I und II umgesetzt. Durch anschließendes Ansäuern mit Citronensäure erhält man die geschützten Aminosäuren in hoher Ausbeute.

5.1.1. [1-(1-Adamantyl)-1-methylethyl]phenylcarbonat (Adpoc-OPh)

Das zu Anfang oft benutzte 1-(1-Adamantyl)-1-methylethyl-phenylcarbonat erweist sich als nicht ganz unproblematisch. Das im käuflichen Chlorameisensäurephenylester enthaltene Phenol führt unter Reaktionsbedingungen oft zu beträchtlichen Mengen an Diphenylcarbonat, welches die Aufarbeitung erschwert. Bei der Umsetzung mit den Aminosäuren fällt schwer abtrennbares Phenol an, dadurch gestaltet sich die Reindarstellung der Aminosäurenderivate oft schwierig. Schließlich erfordert die Acylierung mit dem Carbonat Reaktionstemperaturen von 50°C während 3 Stunden. Dies kann zu einem thermischen Zerfall der gebildeten Produkte führen.

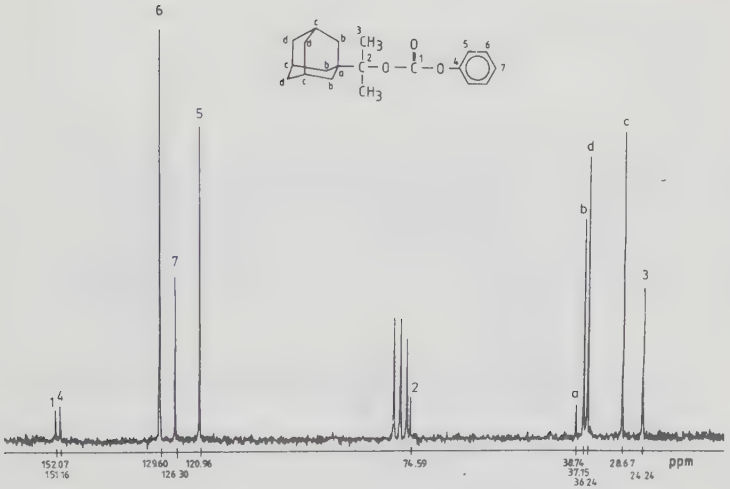
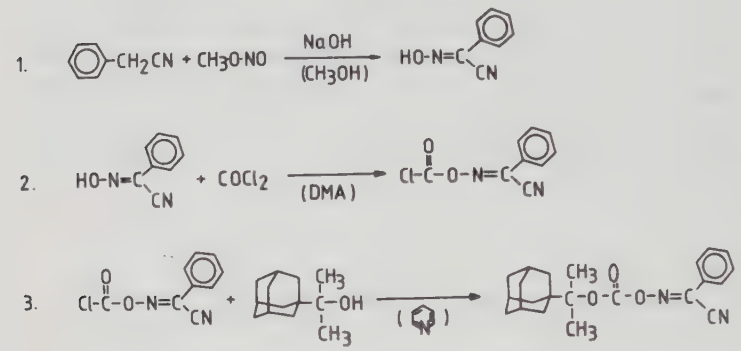


Abb. 24: ^{13}C-NMR von [1-(1-Adamantyl)-1-methylethyl]-phenylcarbonat; Protonenbreitbandentkoppelt, 22.63 MHz, 240 mg in 1 ml $CDCl_3$, 18440 Pulsinterferogramme.

5.1.2. 2[1-(1-Adamantyl)-1-methylethoxycarbonyloximino]-2-phenylacetonitril oder Adpoc-ON

Dieses Reagens wird nach folgendem Schema hergestellt:



Syntheseschema 11: Darstellung von Adpoc-ON

Adpoc-ON ist eine kristalline (Fp. 100-101°C), in guten Ausbeuten darstellbare, reaktive Substanz, welche Umsetzungen mit Aminosäuren bei Raumtemperatur in Wasser/Dioxan erlaubt. Die Aufarbeitung gestaltet sich recht einfach, sodaß dieses Reagens eine echte Alternative zum Carbonat darstellt.

5.1.3. Fluorameisensäure-[1-(1-Adamantyl)-1-methylethyl]-ester (Adpoc-F)

Adpoc-F ist ein hochreaktives Reagens zur Einführung der Adpoc-Gruppe in Aminosäuren. Mit Hilfe des nun einfacher zugänglichen Fluorcarbonylchlorids COClF [127] (s.App.auf S.53) kann es in hohen Ausbeuten (über 90 %) erhalten werden.

Obwohl es kristallin darstellbar ist (Fp. 52°C, ν_{CO} 1815 cm^{-1}), wird es zweckmäßigerweise in Lösung eingesetzt. In dieser Form ist es im Kühlschrank mehrere Monate unzersetzt haltbar.

Die Acylierung kann bei 0 bis -10°C vorgenommen werden, die Reaktionszeiten betragen oft nur wenige Minuten.

Dabei werden die Triton-B-Salze der Aminosäuren in absolutem Dimethylformamid mit Adpoc-F umgesetzt; weiterhin gibt es aber auch die Möglichkeit, die N-Acylierung bei 0°C in wässrig-organischer Lösung vorzunehmen.

Die Reaktivität dieser Verbindung ist außerordentlich hoch; so werden bei der Reaktion mit Histidin in über 80 % Ausbeute das Bis-Adpoc-Histidin erhalten. Aufgrund der hohen Reaktivität ist es denkbar, daß auch höhere Peptide nachträglich N-acyliert werden können.

Eine modifizierte Apparatur, wie sie zur Darstellung von Adpoc-Fluorid verwendet wurde, zeigt untenstehende Abbildung.

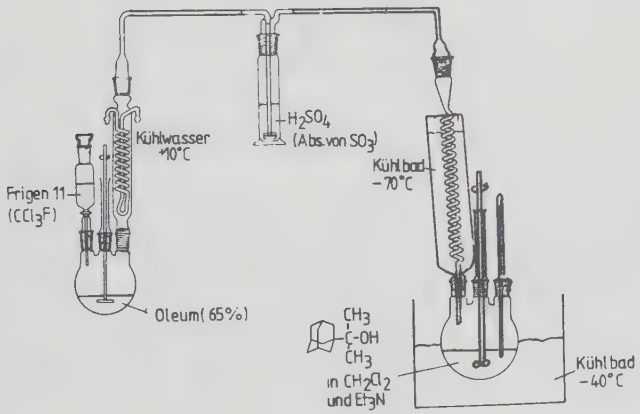


Abb.25 : Apparatur zur bequemen Darstellung von Fluorcarbonylchlorid und gleichzeitiger Umsetzung mit 2-(1-Adamantyl)-propanol(2).

Die Umsetzung des Carbinols mit COClF läßt sich im IR gut zeigen:

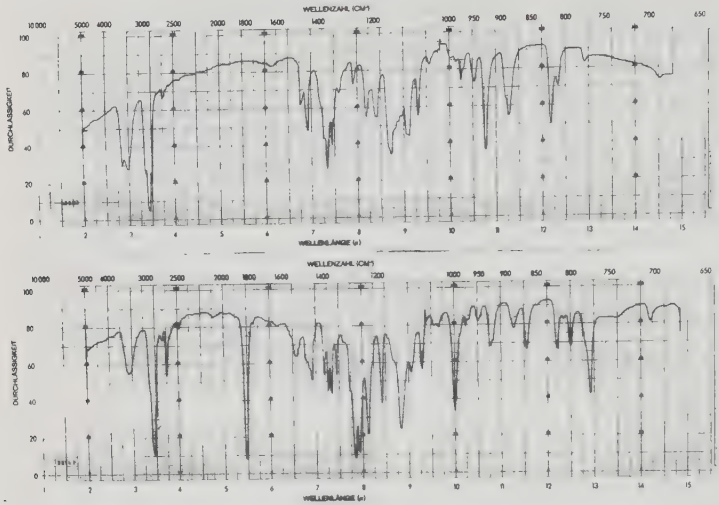


Abb.26 oben:
IR-Spektrum von 2-(1-Adamantyl)2-propanol aufgenommen in KBr.
unten:
Nach Umsetzung mit COClF zum 2-(1-Adamantyl)-2-propyloxycarbonylfluorid ($\gamma_{C=O}$ bei 1815 cm^{-1}), aufgenommen in KBr.

Tabelle 4: Zusammenstellung der mittels 2-(1-Adamantyl)-2-propyloxycarbonylfluorid (Adpoc-F) synthetisierten Adpoc-Aminosäuren

Adpoc-Derivat von	Summenformel (Mol.Gew.)	Ausbeute %	Fp. [°C] (Umkrist.aus	$[\alpha]_D^{23}$	Oben Ber. / Unten Gef. C	H	N	R f_D
Ala.DCHA	$C_{29}H_{50}N_2O_4$ (490.73)	83	159-160 (Ether/Hexan)	+6.22 (c=0.7, EtOH)	70.98 71.20	10.27 10.17	5.70 5.79	0.49
Gln	$C_{19}H_{30}N_2O_5$ (366.46)	74	98 (EE/Ether)	-2.96 (c=0.8, EtOH)	62.27 62.55	8.25 8.19	7.64 7.49	0.44
Gly	$C_{16}H_{25}NO_4$ (295.38)	78	181 (MeOH/Ether)		65.06 64.79	8.53 8.72	4.74 4.81	0.45
His	$C_{20}H_{29}N_3O_4$ (375.47)	4 a)	179-181 (MeOH/Ether)		63.98 63.09	7.98 7.73	11.19 11.43	0.33
His His(Bis-Adpoc)	$C_{34}H_{49}N_3O_6$	87	113 (Zers.) (Petrolether)	+9.25 (c=0.5, DMF)	68.54 67.84	8.29 8.55	7.05 6.79	0.63
Lys(Z).DCHA	$C_{40}H_{63}N_3O_6$	83	75 (n-Hexan)	-4.5 (c=0.9, MeOH)	70.45 70.09	9.31 9.47	6.16 6.05	0.80
Met.DCHA	$C_{31}H_{54}N_2O_4S$	74	150 (Isoprop./ n-Hexan)	-22.8 (c=0.8, MeOH)	67.60 66.98	9.88 9.53	5.08 4.40	0.51

Tabelle 4 (Fortsetzung)

Adpoc-Derivat von	Summenformel (Mol.Gew.)	% Ausbeute	Fp. [°C] (Umkrist.aus	$[\alpha]_D^{23}$	Oben Ber. Unten Gef. C	H	N	Rf_D
Leu	$C_{20}H_{33}NO_4$ (352.49)	89	176 (Ether/ n-Hexan)	-12.8 (c=1,MeOH)	67.81 68.34	9.70 9.46	4.01 3.98	o.63
Phe.DCHA	$C_{34}H_{52}N_2O_4$ (566.83)	77	124 (Isoprop./ n-Hexan)	+21.8 (c=1,2, MeOH)	74.16	9.60	4.94	o.54
Val.DCHA	$C_{34}H_{52}N_2O_4$ (552.82)	79	105 (Isoprop./ n-Hexan)	+7.8 (c=0.9, MeOH)	71.77 71.27	1o.49 1o.16	5.4o 5.31	o.56
Thr(Bzl)	$C_{25}H_{35}NO_5$ (429.56)	71	50-52 (Ether/n-Hexan)	+19.8 (c=1,MeOH)	69.8o 7o.12	8.21 8.3o	3.26 3.24	o.72
Thr(Bzl). DCHA	$C_{37}H_{58}N_2O_5$ (61o.88)	94	13o-131 (n-Hexan)	+12.9 (c=1,MeOH)	72.75 72.44	9.57 9.81	4.58 4.89	o.7o
Trp	$C_{25}H_{32}N_2O_4$ (424.54)	86	116 (Ether/n-Hexan)	-6.8 (c=1,MeOH)	7o.53 7o.91	7.6o 7.75	6.6o 6.66	o.6o
Trp-OSu	$C_{29}H_{35}N_3O_6$ (521.62)	92	67-69 (Isoprop./ Ether)	-19.6 c=1,DMF)	66.78 66.94	6.76 6.45	8.o5 8.21	o.73

a) Entsteht bei der Darstellung von Adpoc-His(Adpoc)-OH. Abtrennung über Kieselgel 1.$CHCl_3$, 2. $CHCl_3$/MeOH 1:1.

5.2. ^{13}C-NMR-Spektroskopie von Adpoc-Aminosäuren

Adpoc-Aminosäuren zeigen im ^{13}C-NMR-Spektrum deutlich 4 Adamantanresonanzsignale im aliphatischen Bereich zwischen 43 und 29 ppm (s.Abb. 27 und Tabelle 5).

Die Signale der quartären C-Atome in Position (c) erscheinen gegenüber den Signalen der -CH_2-Gruppen in Position (d) bei höherem Feld. Diese Abschirmung kann als Folge der Van-der-Waals-Wechselwirkung zwischen dem Aminosäurensubstituent in Position (a) und den H-Atomen in Position (d) erklärt werden [103].

Gegenüber Boc-Aminosäuren erscheinen die Signale der Dimethylgruppen bei wesentlich höherem Feld (19-22 ppm, Boc: ca. 28 ppm) während das quartäre C-Atom deutlich nach tiefem Feld verschoben wird (87 - 89 ppm; Boc: 78 ppm).

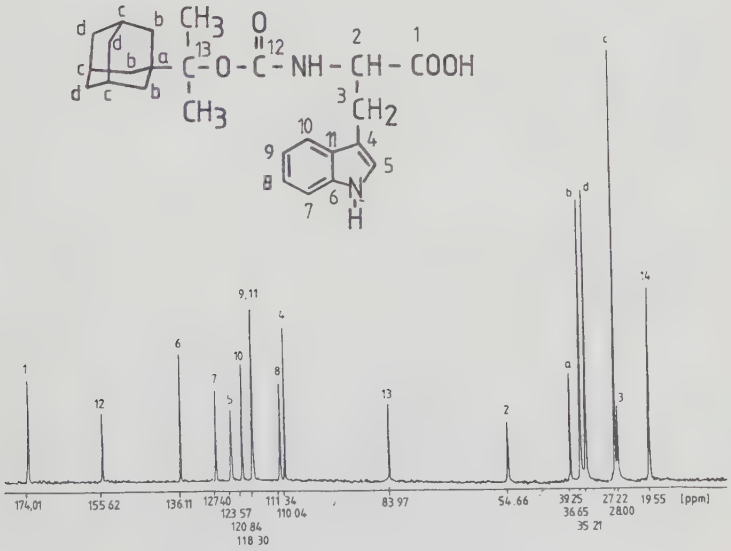


Abb.27 : ^{13}C-NMR-Spektrum von Adpoc-Trp-OH ; protonenbreitbandentkoppelt, 20.115 MHz , 210 mg in 1 ml ^{12}C-DMSO-d_6, 78 000 Pulsinterferogramme.

Tabelle 5 : ^{13}C-chemische Verschiebungen einiger Adpoc-Aminosäuren. Die ppm-Werte sind auf TMS = 0 bezogen. Für die Bezeichnung der Adpoc-Gruppe s. Abb. 27

Aminosäurehälfte						Adpoc-Gruppe					
Verbindung (Lösungsmittel)	COOH (O-CO-)	C_α	C_β	C_γ	Arom.	a	b	c	d	C_q	CH_3
Gly-OH (D_2O/NaOD)	179.90 (160.49)	47.06				42.16	39.48	31.13	38.23	88.98	22.19
Gly-OH (CD_3OD)	172.96 (157.92)	42.69				40.08	37.34	29.22	36.15	86.28	19.44
Ala·DCHA (CD_3OD)	178.99 (156.65)	52.01	19.56			40.07	37.35	29.22	36.21	85.96	19.56
Val.DCHA (CD_3OD)	173.25 (157.05)	61.62	32.17	19.39 17.57		40.02	37.35	29.67	36.15	85.38	19.67
Leu-OH (CD_3OD)	176.20 (157.74)	52.44	40.8	22.61 20.92		40.03	37.3o	29.24	36.06	86.11	19.49
Phe·DCHA (CD_3OD)	177.28 (156.48)	57.36	38.99		138.57 129.82 128.06 126.24	39.96	37.96	29.16	36.09	85.43	19.39

Trp-OH
(DMSO-d_6) siehe Abb. 27.

5.3. Bestimmung der Spaltgeschwindigkeiten mittels HPLC

Trotz einer Vielzahl von Schutzgruppen in der Peptidchemie existieren nur wenige Messungen der Geschwindigkeitskonstanten in der Literatur. Genaue Daten liegen lediglich über die Bpoc-Gruppe vor; der Verlauf der Spaltung wurde durch Bestimmung der freigesetzten Aminogruppen durch Titration mit Perchlorsäure in Eisessig verfolgt [99].

Weitaus mehr Informationen liefert die in den letzten Jahren bei Aminosäuren und Peptiden erfolgreich eingesetzte Hochdruckflüssigkeitschromatographie [104-107]. Neben einer Verfolgung des Edukt-Adukt-Verhältnisses können während der Spaltung auch evtl. auftretende Nebenprodukte mit dieser Methode gut detektiert werden.

Mit Hilfe der"Reversed-phase"-Technik (RP-8 Material, 7 µm Korngröße und 90 % Methanol als mobile Phase)kann eine gute Auftrennung zwischen Adpoc-Trp-OH und H-Trp-OH erreicht werden. Zur Stabilisierung des pH-Wertes und zur Reduktion des bei bipolaren Verbindungen auftretenden Peaktailings wird der wässrige Anteil mittels verdünnter Schwefelsäure auf einen pH von 4.8 gebracht. Durch Eichmessungen kann die lineare Ansprechbarkeit des Detektors gezeigt und der response factor ermittelt werden. Die Bestimmungen der Kurvenflächen erfolgt durch einen angeschlossenen, elektronischen Integrator.

Um Aussagen über die Anwendbarkeit der Adpoc-Gruppe bei tryptophanhaltigen Peptiden treffen zu können, werden die Spaltungsgeschwindigkeiten in verschiedenen Säuregemischen am Beispiel des Adpoc-Trp-OH untersucht:
12.73 mg (3o µmol) Adpoc-Trp-OH werden mit 0.5 ml 3%iger TFA in Methylenchlorid (v/v) bei der entsprechenden Temperatur versetzt und stark gerührt. Nach bestimmten Zeitabständen (15, 30, 45 sec usw.) werden jeweils 20 µl entnommen und die Reaktion durch Einbringen in ein vorbereitetes Reaktionsgefäß, welches 200 µl Methanol und 50 µl 10% NH_3-Lösung enthält, abgestoppt (Meßzeit). Amine eignen sich zur

Neutralisation weniger gut. Nach Eindampfen im Stickstoffstrom wird in 50 µl der mobilen Phase aufgenommen und 5 µl davon werden direkt injiziert.

Abb. 28 zeigt ein Chromatogramm a) 20 sec b) 40 sec nach Behandeln von Adpoc-Trp-OH mit 3 % TFA/CH_2Cl_2 bei 23°C.

Eine Auswertung mehrerer Messungen zeigt, daß die Abspaltung nach einer Reaktion 1. Ordnung verläuft.

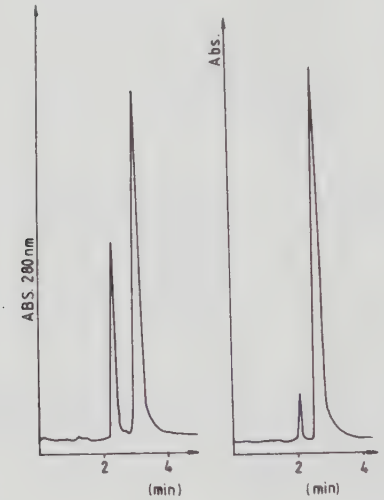


Abb. 28 : HPLC-Chromatogramme der Abspaltung der Adpoc-Gruppe von Adpoc-Trp-OH, links 2o sec., rechts 4o sec. nach Behandeln mit 3 % Trifluoressigsäure/Methylenchlorid bei 23°C.
Bedingungen: RP-8-Säule (25 x o.4 cm), 7 µm Korngröße, Druck 150 bar, Durchflußrate 2 ml/min, mobile Phase: Methanol-Wasser 90:10, der pH-Wert des wässrigen Anteils wird mit verd.Schwefelsäure auf pH 4.8 gebracht, isokratische Bedingungen , Detektion bei 280 nm.

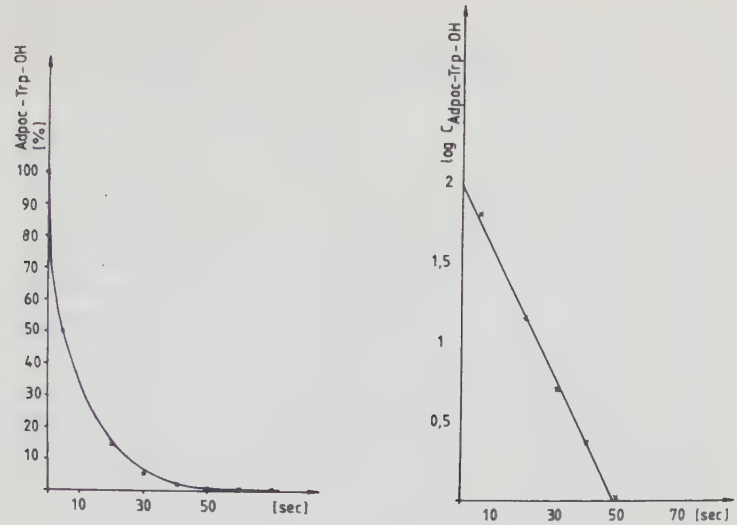


Abb. 29 : Links: Abnahme der Adpoc-Trp-OH-Konzentration während der Abspaltung mit 3 % TFA/CH_2Cl_2 bei 23°C als Funktion der Zeit.
Rechts: Als log c-Zeit-Kurve angegeben.

Wie die Abbildungen zeigen, gelingt die Abspaltung der Adpoc-Gruppe mit 3 % TFA/CH_2Cl_2 bei Raumtemperatur innerhalb 1 - 2 Minuten. Zur Selektivitätsabstufung gegenüber Schutzgruppen des tert.-Butyltyps wird entweder die Abspaltung bei 0°C vorgenommen oder das Säuregemisch Essigsäure-83%ige Ameisensäure (g/g)-Wasser 7:1:2 (v/v) verwendet.

5.3.1. Abspaltung der N^{α}-Adpoc-Gruppe in Anwesenheit einer N^{ε}-Boc-Gruppe

Aus Untersuchungen von Sieber und Iselin [97] ist bekannt, daß die N^{ε}-Boc-Gruppe gegenüber der N^{α}-Boc-Gruppe im sauren Milieu etwa die doppelte Stabilität aufweist.

Da die Adpoc-Gruppe gegenüber N^{α}-Boc-Gruppen eine etwa 700 - 1000-fach höhere Abspaltbarkeit im sauren Bereich aufweist, sind somit günstige Voraussetzungen für eine selektive Abspaltung von N^{α}-Adpoc/N^{ε}-Boc gegeben.

Als Modellsubstanz für eine selektive Abspaltung der Adpoc-Gruppe gegenüber der N^{ε}-Boc-Gruppe des Lysins dient die in Syntheseschema 14 enthaltene Peptidsequenz Adpoc-Trp-Lys(Boc)-OH. Abb.30 zeigt ein HPLC-Diagramm nach Behandeln der Substanz mit dem Essigsäure-Ameisensäure-Wassergemisch bei 35°C. Bei dieser Abspaltungsmethode wird zur Bestimmung von k_1 direkt aus dem Reaktionsgemisch injiziert. Die Referenzverbindung H-Trp-Lys-OH wird durch 15-minütiges Behandeln der Verbindung mit TFA/CH_2Cl_2 (1:1) und 5 % Anisol erhalten. Zusätzlich wird die Abspaltung dünnschichtchromatographisch verfolgt, da sich die Rf-Werte der Reaktanden stark unterscheiden. Beide Methoden zeigen eindeutig, daß unter Einhaltung bestimmter Reaktionsbedingungen eine selektive Abspaltung des Adpoc-Restes gegenüber dem N^{ε}-Boc-Rest möglich ist.

Aufgrund dieser wichtigen Ergebnisse kann die Synthese des Somatostatins im Sequenzbereich 8-14 völlig neu konzipiert werden. Abspaltungsbeispiele im Rahmen größerer Peptideinheiten und in Anwesenheit weiterer säurelabiler Schutzgruppen finden sich in Kapitel V .

In Tabelle 6 sind Halbwertszeiten, Zeiten für eine 99.9%ige Abspaltung und der Geschwindigkeitskonstanten k_1 zusammengestellt.

In dem Reaktionsgemisch Eisessig-Ameisensäure-Wasser erhält man somit folgendes Verhältnis der Geschwindigkeitskonstanten wie

N^{α}-Boc: Adpoc : Bpoc wie	1:600 - 1000 : 1800 - 2700
N^{ε}-Boc: Adpoc : Bpoc wie	1:1500 : 4900 - 6800

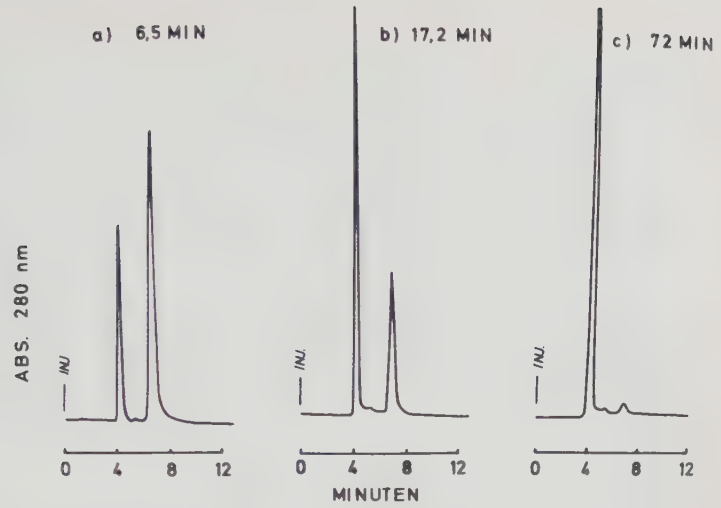


Abb.30 : HPLC-Chromatogramme von Adpoc-Trp-Lys(Boc)-OH nach Behandeln mit Eisessig/83% Ameisensäure(g/g) / Wasser 7:1:2 (v/v) bei 40°C.

Der Anteil an freigeseztem H-Trp-Lys(Boc)-OH beträgt bei

a) 36.48 %
b) 65.99 %
c) 98.63 %.

Der bei t_R = 5,5 Minuten auftretende Peak entspricht einer geringen Verunreinigung (0.72 %) des Ausgangsprodukts.

Bedingungen: RP-8 Säule (25 x 4 cm, 7 µm Partikeldurchmesser);Druck: 140 bar; Durchflußrate: 1,5 ml/min; mobile Phase: 85 % Methanol; 15 % 0.01 Mol Ammoniumacetatlösung; pH 4.7; isokratische Bedingungen. Inj. 2 µl (ca. 70 µg); Detektion bei 280 nm.

Tabelle 6 : Spaltungsgeschwindigkeiten von Adpoc-Trp-OH

Nr.	Säuregemisch	50 %ige Spaltung (Min)	99,9 %ige Spaltung (Min)	k_1 (Min^{-1})	k_{Rel} (Boc = 1)
1	3 % TFA/CH_2Cl_2 25°C	0.18	1.78	3.87	
2	3 % TFA/CH_2Cl_2 0°C	1.1	11.7	0.63	
3a	Eisessig/83 % (g/g)/ Ameisensäure/Wasser 7:1:2 (v/v) 40°C	10.8	107	$6.4.20^{-2}$	
3b	25°C	35.5	354	$1.95.10^{-2}$	590
4	Essigsäure 80 % (v/v) 40°C	34	338	$2.0.10^{-2}$	
Zum Vergleich: (Säuregemisch Nr. 3b)					
Bpoc-Pro-OH	25°C	10.5		$6.5.10^{-2}$	0.30
N^{ε}-Boc-Lys-OH	25°C	36 Tage		$1.3.10^{-5}$	1470
Boc-Gly-OEt	25°C	14 Tage		$3.3.10^{-5}$	

5.4. Abspaltungsmechanismus

Nach erfolgter Desacylierung von Adpoc-Aminosäuren oder -Peptiden kann durch Extraktion mit Hexan die freigesetzte Adamantanverbindung erhalten werden. Durch Massenspektrometrie und Infrarotspektroskopie kann man zeigen, daß sich das entstehende Carbenium-Ion in wasserfreiem Reaktionsmedium (TFA/CH_2Cl_2) zum 2-(1-Adamantan)-propen, in wasserhaltigem Abspaltungsmilieu (Essigsäure/Ameisensäure/Wasser) zusätzlich zum entsprechenden Carbinol stabilisiert.

Die Abspaltung im sauren Medium verläuft daher sehr wahrscheinlich nach dem A_{AL}-Mechanismus (sauer katalysierte, monomolekulare Sauerstoff-Alkylspaltung bei Estern) gemäß folgendem Schema:

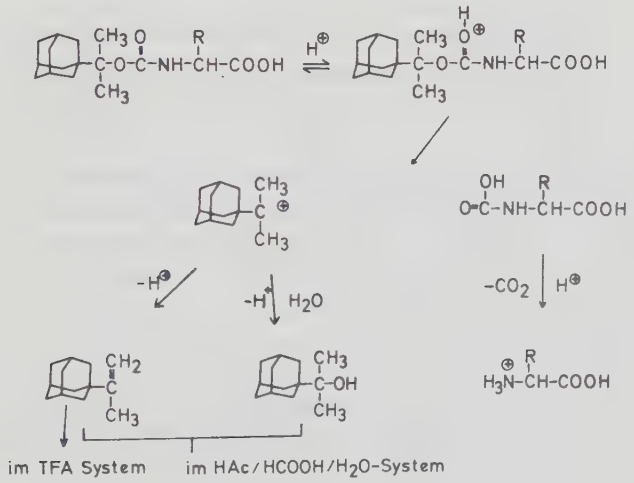


Abb. 31 :Acidolytische Spaltung der Adpoc-Gruppe aus Adpoc-Aminosäuren.

5.5. Stabilität der Adpoc-Aminosäuren

Im Gegensatz zu Bpoc-Aminosäuren, welche in freier Form zur autokatalytischen Zersetzung neigen und nur in Form der DCHA-Salze gelagert werden können und den Ddz-Aminosäuren, welche lichtsensitiv sind (Lagerung und Reaktionen mit Ddz-Aminosäuren müssen unter Lichtausschluß durchgeführt werden), zeigen Adpoc-Aminosäuren sowohl in freier Form als auch in Lösung sehr gute Haltbarkeit. Gegen Lichteinwirkung sind Adpoc-Aminosäuren völlig stabil.

Zur Prüfung werden Adpoc-Trp-OH und freies H-Trp-OH in 80%igem Methanol (0.1 mmolare Lösung) gelöst und bei Raumtemperatur 3 Monate bei normalen Lichtverhältnissen belassen. Nach dieser Zeit hat sich die tryptophanhaltige Lösung gelb-braun verfärbt, während die Adpoc-Trp-OH-Lösung völlig farblos bleibt.

Durch HPLC-Untersuchungen kann gezeigt werden, daß durch die Lichteinwirkung mindestens 3 Nebenprodukte mit lipophilem Charakter entstehen, wohingegen das Adpoc-geschützte Tryptophan stabil bleibt.

Diese Veränderungen werden auch im UV-Spektrum deutlich. Während das UV-Spektrum von Adpoc-Trp-OH gegenüber einer frisch angesetzten Tryptophanlösung nahezu identisch ist, zeigt die gelagerte Tryptophanlösung eine deutliche Absorptionsverschiebung zum langwelligen Bereich (440 nm). Schwach ausgeprägte Maxima finden sich bei 318 nm und 385 nm. Kürzlich angestellte Untersuchungen bei tryptophanhaltigen Peptiden ergaben, daß durch Photooxidation von Tryptophan - auch in Abwesenheit von Sauerstoff - ein sehr komplexes Gemisch entsteht.

Als Hauptkomponenten wurden ß-(3-Oxindolyl)-alanin und N-Formylkynurenin identifiziert [133].

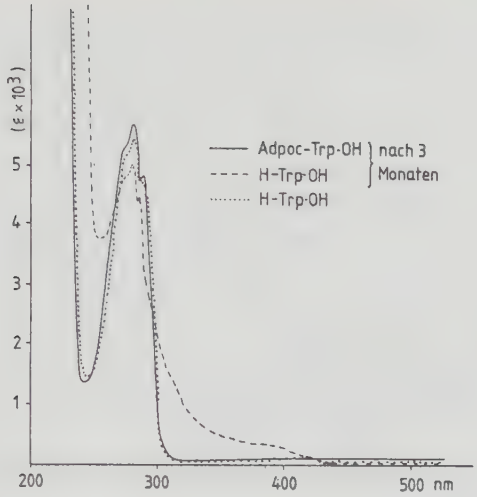


Abb.: 32 UV-Spektrum von Adpoc-Trp-OH und H-Trp-OH nach 3-monatiger Lagerung bei normalen Lichtverhältnissen im Vergleich mit einer frisch hergestellten Tryptophan-Lösung in 80%igem Methanol

V. Synthese von Somatostatin mit Hilfe der Adpoc-Gruppe (Syntheseweg 2)

1. Darstellung des Heptapeptids H-Trp-Lys(Z)-Thr(Bzl)-Phe-Thr(Bzl)-Ser(Bzl)-Cys(Trt)-OH (Sequenz 8-14)

Die hohe Säurelabilität der Adpoc-Gruppe erlaubt die Synthese der C-terminalen Peptidsequenzen 8-14 nach einer völlig neuen Synthesestrategie.

Um die Eigenschaften der Adpoc-Gruppe an einem größeren Peptid zu erproben, wird zunächst ein Synthesekonzept entwickelt, welches den Schutz der N^{ε}-Aminogruppe des Lysins mit dem Z-Rest vorsieht. Die Hydroxylfunktionen von Threonin und Serin werden als Benzylether, die Thiolfunktion des Cysteins als Tritylether geschützt.

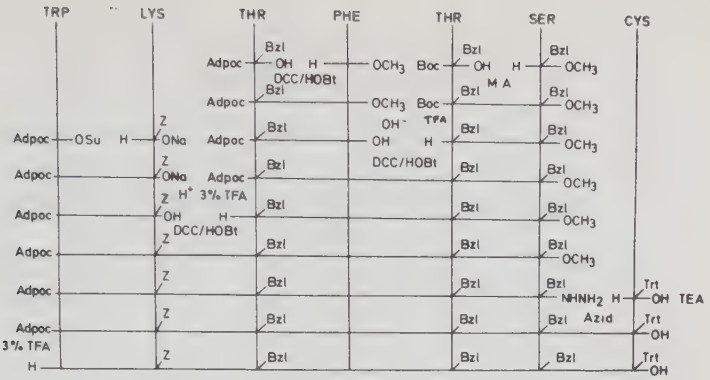
Damit sollen folgende Eigenschaften der Adpoc-Gruppe getestet werden:

1. Aufarbeitung und Löslichkeit größerer Peptidverbände,
2. Alkalistabilität,
3. Stabilität bei Hydrazinolyse,
4. Stabilität der Adpoc-Gruppe bei Azidkupplungen und die Abspaltung der Adpoc-Gruppe bei höheren Peptiden.

Die Synthese des Fragments 8-14 wird nach folgendem Reaktionsschema durchgeführt (s.folgende Seite):

Der durch DCC/HOBt-Kupplung gut zugängliche Dipeptidester Adpoc-Thr(Bzl)-Phe-OMe (89.4 % Ausbeute) läßt sich ohne Schwierigkeiten unter üblichen Bedingungen (1 N NaOH, 1 Std.) zur freien Säure verseifen.

Durch Reaktion von Boc-Thr(Bzl)-Ser(Bzl)-OMe mit TFA/CH_2Cl_2 wird die Boc-Gruppe abgespalten und das Dipeptid zum geschützten Tetrapeptid 10-13 Adpoc-Thr(Bzl)-Phe-Thr(Bzl)-Ser(Bzl)-OMe umgesetzt.



Syntheseschema 12 : Synthese des C-terminalen Heptapeptids H-Trp-Lys(Z)-Thr(Bzl)-Phe-Thr(Bzl)-Ser(Bzl)-Cys(Trt)-OH (Syntheseweg 2) von Somatostatin.

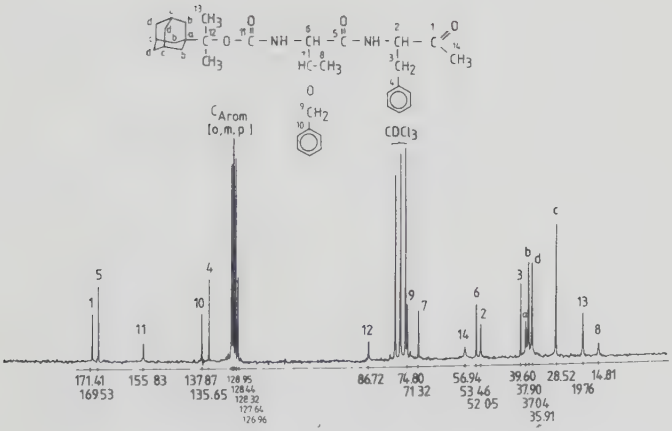


Abb. 33 : ^{13}C-NMR-Spektrum von Adpoc-Thr(Bzl)-Phe-OCH_3; Protonenbreitbandentkoppelt, 20.115 MHz, 210 mg in 1 ml $CDCl_3$, 72 000 Pulsinterferogramme.

Die nun folgende Abspaltung der Adpoc-Gruppe mit 3 % TFA/ CH_2Cl_2 wird bei 0^oC vorgenommen und der Verlauf der Reaktion dünnschichtchromatographisch verfolgt.

Tabelle 7: Abspaltung der Adpoc-Gruppe in Adpoc-Thr(Bzl)-Phe-Thr(Bzl)-Phe-OCH_3 mit 3 % TFA in CH_2Cl_2.

Zeit	Anteil an freigesetztem H-Thr(Bzl)-Phe-Thr(Bzl)-Ser(Bzl)-OMe.TFA (Werte aufgrund UV_{254} Absorption bestimmt).
0.5 Min	20 %
1.0 Min	40 %
3.0 Min	70 %
5.0 Min	85-90 %
20.0 Min	100 %

Die graphische Auswertung (log c/Zeit-Kurve) der nach einer Reaktion 1.Ordnung verlaufenden Abspaltung ergibt eine Geschwindigkeitskonstante k_1 von o.31 (Min^{-1}). Daraus errechnet sich die Halbwertszeit von 2.1 Minuten.

Ein Vergleich der Werte in Tabelle 6 , welche bei Aminosäuren gewonnen wurden, zeigt, daß der k-Wert gegenüber den Aminosäurenderivaten auf die Hälfte absinkt; für die Abspaltung der Adpoc-Gruppe beim Tetrapeptid ist daher die doppelte Reaktionszeit erforderlich. Dies steht im Einklang mit den Abspaltungseigenschaften der Boc-Gruppe bei höheren Peptiden.

Durch Reaktion des kristallinen Adpoc-Tryptophan-N-hydroxysuccinimidesters mit dem Natriumsalz von N^{ε}-Z-Lysin in DMF / Wasser kann sofort das kupplungsfähige Dipeptid Adpoc-Trp-Lys(Z)-OH gewonnen werden, welches durch eine übliche DCC/ HOBt-Kupplung mit dem freien Tetrapeptid 10 - 13 umgesetzt wird. Das so erhaltene Hexapeptid Adpoc-Trp-Lys(Z)-Thr(Bzl)-Phe-Thr(Bzl)-Ser(Bzl)-OMe ist sehr gut löslich in organischen Lösungsmitteln, wie z.B. Ether, und erlaubt demzufolge eine relativ einfache Aufreinigung. Das durch Hydrazinolyse gewonnene Hexapeptidhydrazid fällt in sehr hoher Reinheit an (Fp. scharf bei 174^oC, sehr gute Elementaranalyse).

Die nun folgende Azidkupplung wird entgegen der früheren Arbeitsmethode mit tert.-Butylnitrit anstatt Isoamylnitrit durchgeführt. Tert.-Butylnitrit ist wesentlich reaktionsfähiger als der primäre Ester; daraus resultieren 2 Vorteile: Während der Azidbildung ist nur noch ein Säureüberschuß von einem Äquivalent (Isoamylnitrit: 3 Äquivalente) und nur ein geringer Reagenzüberschuß von 0.1 Äquivalente (Isoamylnitrit: 0.3 Äquivalente notwendig, wodurch die Säurebelastung und die Nitrosierungsreaktionen besonders für Tryptophan stark reduziert werden.

Auf diese Weise kann das Fragment 8-13 in 82.4 % Ausbeute mit dem Triethylammoniumsalz des S-Tritylcysteins zum Heptapeptid 8-14 umgesetzt werden.

Die Abspaltung der am N-terminalen Tryptophan stehenden Adpoc-Gruppe wird mit 3 % TFA in Methylenchlorid vorgenommen und der Verlauf dünnschichtchromatographisch verfolgt. Die Abspaltungsraten werden aufgrund der UV-Absorption bei 254 nm geschätzt.

Je 90 mg Adpoc-Trp-Lys(Z)-Thr(Bzl)-Phe-Thr(Bzl)-Ser(Bzl)-Cys (Trt)-OH werden bei 0°C verschiedenen Säurekonzentrationen ausgesetzt. Zusätzlich wird 1o % Anisol zugesetzt.

Tabelle 8 : Abspaltung der Adpoc-Gruppe in Adpoc-Trp-Lys(Z)-Thr(Bzl)-Phe-Thr(Bzl)-Cys(Trt)-OH.

Säuremedium	50 % Spaltung	100 % Spaltung
3 % TFA/CH_2Cl_2+ 1o % Anisol	4 Min.	35 Min.
5 % TFA/CH_2 Cl_2 + 10 % Anisol	2 Min.	15 Min.

Eine Veränderung des DC-Verhaltens oder der Farbe kann durch Erhöhen der Protonenkonzentrationen nicht festgestellt werden. In beiden Fällen bleibt die Reaktionslösung völlig farblos.

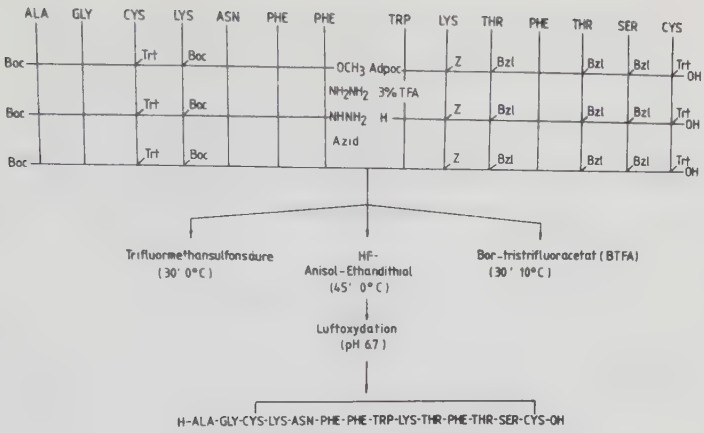
Da beim Einengen von Trifluoressigsäurelösungen in Methylenchlorid eine Aufkonzentrierung der Trifluoressigsäure stattfindet, können die Abspaltungen bei definierten, schonenden Bedingungen während des Eindampfens in unkontrollierbarer Weise zu unerwünschten Nebenreaktionen führen.

Fügt man der Reaktionslösung nach Beendigung der Reaktion 2 Volumäquivalente Benzol zu, so wird zunächst das TFA/Methylenchlorid-Gemisch entfernt; zusätzlich wird die Reaktionslösung so weit verdünnt, daß eine Weiterreaktion kaum mehr stattfindet.

Das freie Heptapeptid kann nun in gleicher Weise unter Honzl-Rudinger Bedingungen mit dem in Syntheseschema 5 beschriebenen Heptapeptid 1-7 in einer Azidkupplung zum geschützten Tetradecapeptid umgesetzt werden. Das geschützte Somatostatin zeigt sowohl nach Aminosäurenanalyse als auch nach der Elementaranalyse sehr gute Übereinstimmung mit den berechneten Werten. Damit ist ein Syntheseweg geschaffen, der unter Zuhilfenahme der säurelabilen Adpoc-Gruppe zum geschützten Somatostatin führt.

2. Saure Entfernung der Schutzgruppen und Oxidation zum cyclischen Somatostatin

Die gewählte Schutzgruppenstrategie erfordert relativ drastische Abspaltungsbedingungen. Neben der bekannten Fluorwasserstoff-Anisol-Abspaltungsmethode, welche durch Untersuchungen von Wünsch [94], Losse [143], Yajima [141] und Shimonishi [142] als nicht mehr unproblematisch gilt (Alkylierungsreaktionen beim Tryptophan, N→O Acylverschiebung u.a.) wurden in jüngster Vergangenheit alternative Acidolysen vorgestellt. So werden Trifluormethansulfonsäure [50, 139] und Bortristrifluoracetat [51, 140] als weiterführende Verbesserung der Deblockierungsbedingungen empfohlen. Beide Reagenzien werden auf ihre Eignung für die Darstellung von Somatostatin getestet.



Syntheseschema 13 : Synthese von cyclischem Somatostatin nach dem Syntheseweg 2.

Nach erfolgter Abspaltung werden die freien Peptide in hochverdünnter Lösung (1 mg/10 ml, 5 mmolarer Ammoniumacetatpuffer, pH 6.7) an der Luft während 72 Stunden oxidiert. Nach doppelter Gefriertrocknung zur weitestgehenden Entfernung des NH_4Ac werden die Produkte an Sephadex G 25 gelfiltriert (2N Essigsäure als Elutionsmittel) und die Fraktionen dünnschichtchromatographisch in mindestens 5 Fließmittelsystemen untersucht.

Die Oxidation zum cyclischen Somatostatin wird durch HPLC-Messungen in einem Isopropanol-Ammoniumacetatpuffersystem (pH 4.4) an RP 8-Material verfolgt. Die weitere Aufreinigung der durch G-25 Chromatographie erhaltenen Fraktionen wird durch Ionenaustauschchromatographie an Carboxymethyl-Cellulose oder durch weitere Gelchromatographie an LH 20 durchgeführt.

2.1. Ergebnisse der Abspaltungsreaktionen

2.1.1. Abspaltung mit Trifluormethansulfonsäure

Trifluormethansulfonsäure als nichtoxidierendes Abspaltungsreagens wird von Yajima et al. [50, 139] zur Deblokkierung O-benzylgeschützter und N-carbobenzoxygeschützter Peptide empfohlen. Unter den angegebenen Bedingungen (30',0°C) können jedoch weder durch Dünnschichtchromatographie noch durch HPLC-Messungen nennenswerte Mengen an Somatostatin gefunden werden.

2.1.2. Abspaltung mit Bortristrifluoracetat (BTFA)

Eigenschaften ähnlich denen von Fluorwasserstoff soll das von Bauer und Pless [51, 140, 145] vorgestellte Spaltungsreagens aufweisen. Als wirkungsvoller Kationenfängerzusatz wird Thioanisol,welches 2 nucleophile Zentren besitzt, empfohlen. Wie die Dünnschichtchromatographie als auch die HPLC zeigen , werden mit dieser Methode deutlich erkennbare Mengen an Somatostatin gebildet. Abb. 34 zeigt die Qualität des nach einer G-25 Gelchromatographie mit 2N Essigsäure erhaltenen cyclischen Somatostatins. Ohne Optimierung der Reaktionsbedingungen liegt die Rohausbeute bei ca. 20 - 30 % d.Th., inzwischen sind jedoch verbesserte Reaktionsbedingungen bekannt geworden [145].

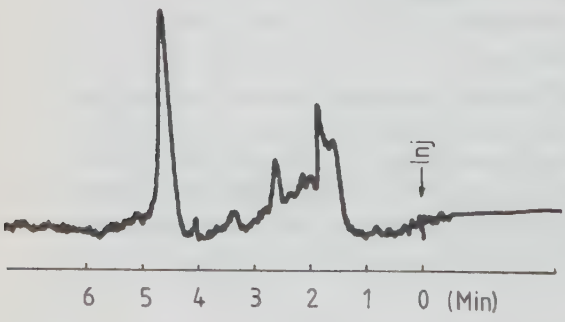


Abb.: 34
HPLC-Chromatogramm der durch G 25 Chromatographie vorgereinigten somatostatinhaltigen Fraktionen. Abspaltung der Schutzgruppen mit Bortristrifluoracetat. Bedingungen s.Abb.35. Der bei t_R= 4.7 Min. auftretende Peak ist retentionszeitgleich mit einer Referenzprobe von cyclischem Somatostatin.

2.1.3. Abspaltung mit HF/Anisol/Ethandithiol

Bekanntlich ist das Indolsystem unter sauren Bedingungen stark oxidationsempfindlich, daneben werden verschiedene Alkylierungsprodukte bei sauren Abspaltungen gefunden. Die Verwendung von Anisol-Ethandithiol (10:1) als Zusatzkomponenten bei Abspaltungen mit Fluorwasserstoff sollen diese Nebenreaktionen weitgehend unterdrücken [141].

Die Behandlung des nach Syntheseschema 13 erhaltenen geschützten Tetradecapeptids mit HF/Anisol/Ethandithiol (100:10:1) führt zu einem relativ einheitlichen, schwach bräunlichen Produkt. Dünnschichtchromatographische Untersuchungen in neutralen bis sauren Fließmittelsystemen (schnelle Oxidationen von Somatostatin werden erst bei einem pH > 7 beobachtet [145]), zeigen das Vorliegen einer Hauptkomponente, welche eine deutliche Reaktion mit Ellmans -Reagens zeigt.

Der Oxidationsschritt wird durch Luftoxidation in verdünnter Lösung (0.005 m Ammoniumacetatpuffer, pH 6.7) vorgenommen. Der Verlauf der Oxidation kann durch HPLC-Messungen direkt verfolgt werden. Bereits nach 30 Minuten wird im HPLC-Chromatogramm ein Peak beobachtet,welcher retentionszeitgleich mit einer Referenzprobe ist (s.Abb. 35).

Während der Oxidation wird die Lösung zunehmend trübe (Polymerenbildung); nach 72 Stunden wird die Lösung filtriert, im Vakuum bei 10°C Badtemperatur eingeengt und gefriergetrocknet. Man erhält ein farbloses Produkt, das durch Chromatographie an G 25 (Fine) in 2 N Essigsäure vorgereinigt wird.

Die durch intermolekulare Oxidationen entstandenen polymeren Anteile werden scharf bei V_o eluiert. Fraktionen 20 - 24 enthalten neben weiteren Nebenprodukten große Anteile an Somatostatin, wie durch Dünnschichtchromatographie in verschiedenen Fließmittelsystemen gezeigt werden kann.

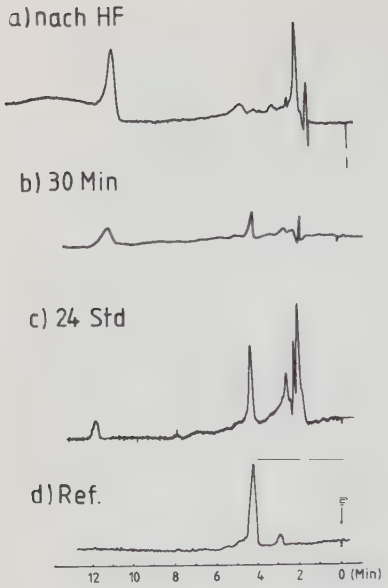


Abb. 35 : Verfolgung der Oxidation von linearem Somatostatin an der Luft mittels HPLC.
Bedingungen: RP-8, 7 µm; Säule: 25 x o.4 cm. Mobile Phase: 33 % Isopropanol in 0.01 m NH_4Ac-Lösung (pH 4.25) Durchflußrate 2.0 ml bei 270 bar. Detektion bei 254 nm.

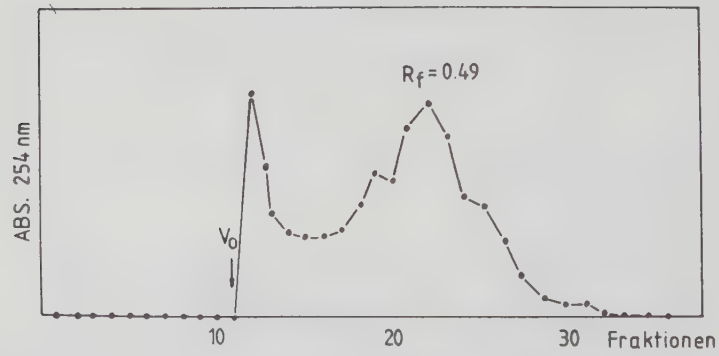


Abb. 36 : Gelfiltration von rohem, oxidiertem Somatostatin an G 25 (fine). Säule : 1.4 x 85 cm. Elutionsmittel: 2 N Essigsäure V_o = 60.1 ml. Volumen jeder Fraktion = 5.5 ml. Aufgetragene Menge 40 mg. Fraktion 20 - 24 15.9 mg.

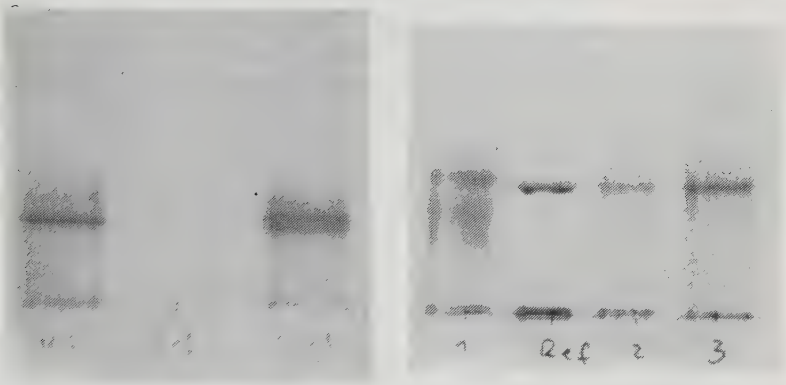


Abb. 37 : Dünnschichtchromatogramme der nach HF-Hydrolyse (lineares Somatostatin, im Chrom. als "HF" oder "1" bezeichnet), einfacher G 25-Chromatographie (im Chrom. als "3" bezeichnet) bzw. nach doppelter G 25-Chromatographie (im Chrom. als "2" bezeichnet) erhaltenen Produkte im Vergleich mit einer Referenzprobe [+]. Kieselgelplatten 60 F 254. Anfärbung mit Ninhydrin.
Fließmittelsysteme:
Links: n-Butanol-Eisessig-Wasser 4:1:5 (Oberphase).
Rechts: n-Butanol-Pyridin-0.1 % Essigsäure 5:3:11 (Oberphase).

[+] Herrn Dr.R.Geiger von der Fa.Höchst, Frankfurt und Herrn Harrant von der Fa. Serono, Freiburg, danke ich herzlich für kleine Referenzproben an cyclischem Somatostatin.

Die G 25 Fraktionen werden im halbpräparativen Maßstab durch nachfolgende Ionenaustauschchromatographie an speziell gereinigter Carboxymethylcellulose und durch Gelchromatographie an LH 20 weitergereinigt. In beiden Systemen werden die im Fließmittelsystem Butanol-Eisessig-Wasser 4:1:5 sichtbaren Verunreinigungen abgetrennt. Die Ausbeute an reinem Somatostatin bei der CM-Cellulosereinigung ist gering. Dies kann auf starke, unspezifische Adsorptionen, die bei CM-Cellulose oft beobachtet werden, zurückzuführen sein [146].

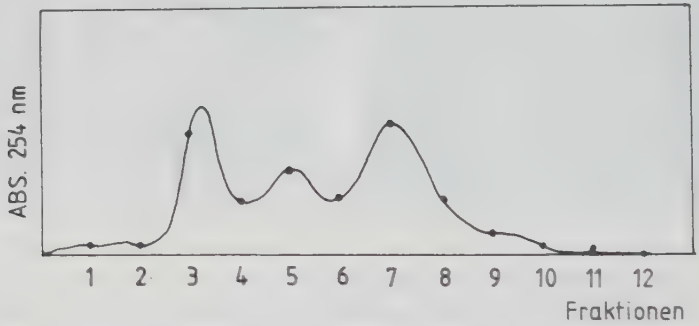


Abb. 38 : Chromatographie von G-25 gereinigtem cyclischen Somatostatin an Carboxymethyl-Cellulose. Säule: 0.6 x 13.5 cm; äquilibriert in 0.025 m Ammoniumacetatpuffer, Elution mit 0.05 m Ammoniumacetatpuffer (pH 7). Fraktionsvolumen = 0.8 ml (à 200 sec); aufgetragene Menge: 3.0 mg. Nach doppelter Lyophilisation werden erhalten: Fraktionen 2-4: 0.53 mg; Fraktion 5: 0.17 mg; Fraktionen 6-8 (Somatostatin): 0.39 mg. Die Fraktionen 2-5 sind mit Ninhydrin nur schwach anfärbbar; Fraktionen 6-8 zeigen identisches Laufverhalten in allen angegebenen dünnschichtchromatographischen Systemen mit einer Referenzprobe.

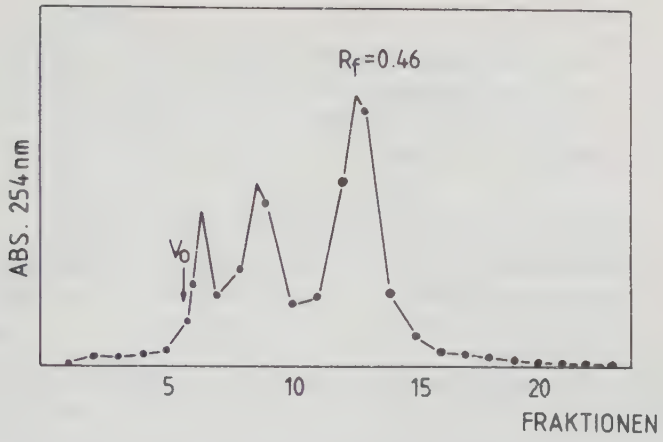


Abb. 39 : Chromatographie von G-25 gereinigtem cyclischem Somatostatin an LH 20. Eluans: 2 N Essigsäure. Säule: 0.6 x 47 cm. V_o: 4.8 ml. Fraktionen à 0.8 ml. Aufgetragene Menge: 3.0 mg. Nach doppelter Lyophilisation werden erhalten: Fraktionen 5-7: 0.37 mg; Fraktionen 8-10 : 0.44 mg; Fraktionen 11-14: 1.28 mg Fraktionen 5-10 geben mit Ninhydrin nur schwache Farbreaktion. Fraktionen 11-14 zeigen identisches Laufverhalten in allen dünnschichtchromatographischen Systemen mit einer Referenzverbindung.

Ergebnis der Aminosäurenanalyse

	Ala	Gly	Cys	Lys	Asp	Thr	Ser	Phe	Trp	NH_3
Ber	1	1	2	2	1	2	1	3	1	
6 N HCl 115°C,18h	o.97	1.o	1.97+	2.o7	o.87	2.12	o.86	2.92	-	2.22
6 N HCl 115°C,18h Zus.v.2.5 % Thioglykolsäure	o.95	1.0	0.92	2.11	o.91	2.o7	o.71	2.87	o.58	2.29

+ Cys wird als Cysteinsäure nach [147] bestimmt.

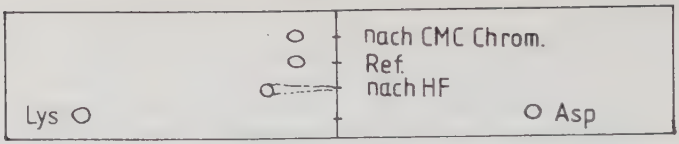


Abb. 40 : Dünnschichtelektrophorese von cyclischem Somatostatin auf Kieselgel 60 F 254-Platten in Eisessig/Pyridin/n-Butanol/Wasser 2.5:2.5:5.0:90 (pH 4.7) 800 V für 60 Minuten

Die Ausbeuten bei dieser Abspaltungsmethode betragen:

a) nach HF-Hydrolyse	95 %
b) nach G 25 Chromatographie	26.9 %
c) nach LH 20 Chromatographie	10.1 %
d) nach CM-Cellulose	3.5 %

(bezogen auf das geschützte Tetradecapeptid).

3. Synthese des Heptapeptids H-Trp-Lys(Boc)-Thr(Bu^t)-Phe-Thr(Bu^t)-Ser(Bu^t)-Cys(Trt)-OH (Sequenz 8-14, Syntheseweg 3)

Wie das voranstehende Kapitel zeigt, ist die Deblockierungsendstufe von synthetischen Peptiden maßgeblich mitbestimmend für deren Ausbeute, Homogenität und damit der biologischen Aktivität.

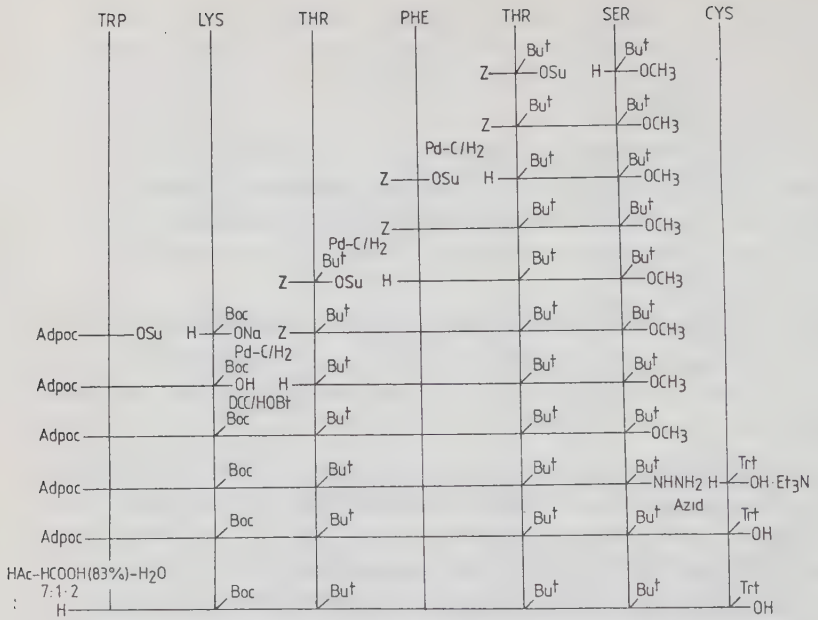
Obwohl die HF-Acidolyse bislang als schonendes und weitgehend von Nebenprodukten freies Demaskierungsverfahren beschrieben wird, wird in letzter Zeit immer mehr von dieser Methode abgegangen. Nach Wünsch kann die HF-Abspaltung bei tryptophanhaltigen Peptiden in Anwesenheit von Schutzgruppen des tert.-Butyltyps bis zu ca. 70 % an Substitutionsprodukten führen, durch Anisolzusatz werden die Anteile zwar gesenkt, betragen aber immer noch 30 %. Demgegenüber werden bei Abspaltungen in TFA, HCl in Wasser oder HCl in organischen Lösungsmitteln diese Nebenreaktionen nicht beobachtet.[95]. Die Verwendung von Schutzgruppen, welche durch Acidolyse mit HCl abgespalten werden können, müßte daher zu einem weitgehend reinen Produkt führen. Die nun gesteigerte

Säureempfindlichkeit der an trifunktionellen Aminosäuren gebundenen Schutzgruppen (z.B. des tert.-Butyltyps) können nur mit einer selektiv abspaltbaren N^{α} - Aminoschutzgruppe kombiniert werden.

Die Verwendbarkeit der Adpoc-Gruppe zur Synthese eines größeren Peptids wurde im voranstehenden Kapitel beschrieben, die selektive Abspaltung gegenüber Schutzgruppen des tert.-Butyltyps konnte durch HPLC- und DC-Untersuchungen gezeigt werden.

Mit Ausnahme des Cysteins, das wie bisher als S-Tritylverbindung eingesetzt wird, finden bei der folgenden Somatostatinsynthese nur Schutzgruppen des tert.-Butyltyps Verwendung.

Dabei wird eine sich an der erfolgreichen Synthese (Schema 2) orientierende (2+4)+1 Fragmentkondensation durchgeführt. Etwas nachteilig ist lediglich die mit nicht unbeträchtlichem Aufwand verbundenen Synthesen der Ausgangsderivate des Serins und Threonins und deren mangelnde Kristallisationstendenz. Als Kupplungsmethode wird vorwiegend die Aktivestermethode (N-Hydroxysuccinimidester) verwendet. Das auf diese Weise hergestellte Dipeptid Z-Thr(Bu^t)-Ser(Bu^t)-OCH_3 wird durch katalytische Hydrierung freigesetzt und mit dem N-Hydroxysuccinimidester von Carbobenzoxyphenylalanin zum Tripeptid verlängert. Zur besseren Reinigung der Zwischenprodukte werden die folgenden beiden Hydrierungen am "pH-Stat" durchgeführt, wobei mittels halbgesättigter HCl in Ether immer ein "pH" von 4-4.5 eingehalten wird. Die kristallin anfallenden Hydrochloride werden während der Kupplung mittels N-Methylmorpholin freigesetzt. Auf diese Weise wird mittels Z-Thr(Bu^t)-OSu zum Tetrapeptid gekuppelt. Diese Verbindung wird zusätzlich auf einer LH 20 Säule mit Methanol gelchromatographiert und anschließend kristallisiert. Der N-Hydroxysuccinimidester des Adpoc-Tryptophans kann nun in bekannter Weise mit dem Natriumsalz des N^{ε}-tert.-Butyloxycarbonyllysins zum kupplungsfähigen Dipeptid umgesetzt werden, welches durch eine DCC/HOBt- Kupplung mit dem hydrogenolytisch freigesetzten Tetrapeptid H-Thr(Bu^t)-Phe-Thr(Bu^t)-Ser(Bu^t)-OCH_3 zum geschützten Hexapeptid reagiert.



Syntheseschema 14 : Synthese des geschützten, C-terminalen Heptapeptids H-Trp-Lys(Boc)-Thr(Bu^t)-Phe-Thr(Bu^t)-Ser(Bu^t)-Cys(Trt)-OH (Syntheseweg 3).

Wie in Syntheseschema 14 beschrieben, wird das Hexapeptidhydrazid durch Azidkupplung mit 2.5 N HCl/THF und tert.-Butylnitrit bei -30°C mit dem Triethylammoniumsalz des S-Tritylcysteins zum Sequenzanteil 8-14 verlängert (Ausbeute 80.5 % d.Th.).

Das so erhaltene Peptid trägt ausschließlich säurelabile Schutzgruppen, die nachfolgende N^{α}-Desacylierung wird daher sorgfältig durch DC und FD-MS untersucht.

Das Heptapeptid Adpoc-Trp-Lys(Boc)-Thr(Bu^t)-Phe-Thr(Bu^t)-Ser(Bu^t)-Cys(Trt)-OH wird nun zwei verschiedenen Säure-

medien ausgesetzt; die Abspaltung wird dünnschichtchromatographisch verfolgt und die Geschwindigkeitskonstanten graphisch ermittelt. Die Halbwertszeiten und die Zeiten für eine 99 %-Abspaltung werden daraus berechnet.

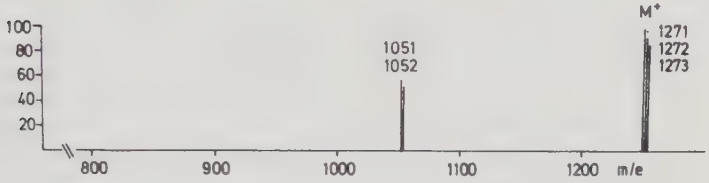


Abb. 41: FD-Spektrum von Adpoc-Trp-Lys(Boc)-Thr(Bu^t)-Phe-Thr(Bu^t)-Ser(Bu^t)-OCH_3 bei erhöhter Emittertemperatur (76°C). Bei dieser Temperatur wird die thermolabile Adpoc-Gruppe bereits partiell abgespalten ($[M-220]^+$-Peak) Weitere strukturrelevante Fragmente werden nicht beobachtet.

Tabelle 9: Abspaltung der Adpoc-Gruppe von Adpoc-Trp-Lys(Boc)-Thr(Bu^t)-Phe-Thr(Bu^t)-Ser(Bu^t)-Cys(Trt) in verschiedenen Säuremedien

1. Essigsäure-Ameisensäure 83% (g/g)-Wasser 7:1:2 (v/v) 40°C

Anteil an freigesetzter N^{α}-Aminogruppe (DC,254 nm, Werte abgeschätzt)	10 Min.	40 %
	20 Min.	60 %
	30 Min.	75 %
	42 Min.	80-85 %
	95 Min.	95 %

k_1: 4.10^{-2} (Min^{-1})

$t_{50\%}$: 17,3 Min.

$t_{99\%}$: 115 Min.

Ausbeute: 86.19 %.

Tabelle 9 (Fortsetzung)

2. 1 % Trifluoressigsäure/Methylenchlorid (v/v) + 5 % Anisol bei 0°C

Anteil an freigesetzter N^{α}-Aminogruppe (DC 254 nm, Werte abgeschätzt)	10 Min.	30 %
	20 Min.	50 %
	30 Min.	60 %
	45 Min.	75 %
k_1: 3.2 . 10^{-2} (Min^{-1})	60 Min.	85 %
$t_{50\%}$: 21 Min.	120 Min.	95-98 %
$t_{99\ \%}$: 141 Min.		
Ausbeute: 88.2 %.		

Um die spurenweise auftretende N^{ε}-Boc-Desacylierung möglichst gering zu halten, wird nur eine 90 - 95 % Abspaltung angestrebt; die unumgesetzte Verbindung kann durch Umfällen aus Ether/Hexan leicht entfernt werden.

Die so erhaltenen Produkte werden mittels FD-MS untersucht und miteinander verglichen.

Die Spektren zeigen sehr gute Übereinstimmung. Eine Abspaltung der N^{ε}-Boc-Gruppe, welche sich deutlich durch einen $(M-100)^{+}$-Peak detektieren läßt, kann in keinem Fall beobachtet werden. Die Felddesorptions-Massenspektrometrie hat sich in diesem entscheidenden und kritischen Schritt der Synthese als wertvolles Instrument zur Untersuchung chemischer Reaktionsabläufe bei höheren Peptiden erwiesen.

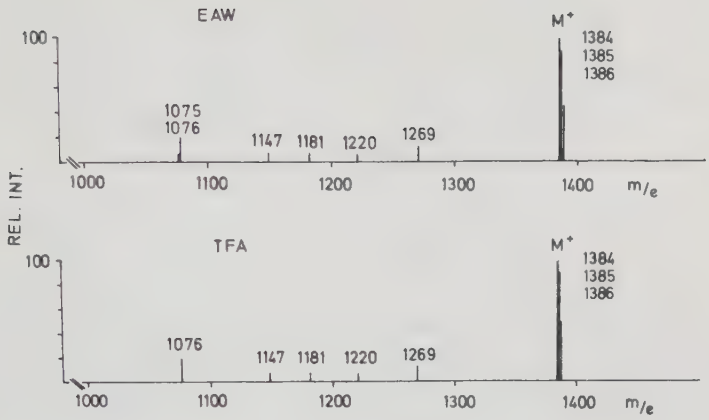
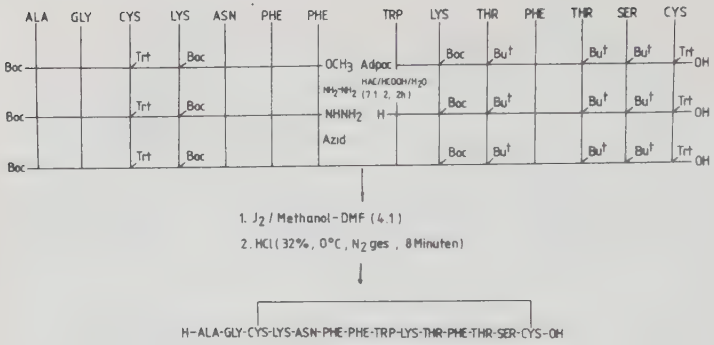


Abb. 42 : FD-MS-Spektrum von H-Trp-Lys(Boc)-Thr(Bu^t)-Phe-Thr(Bu^t)-Ser(Bu^t)-Cys(Trt)-OH, welches durch verschiedene Säurebehandlungen des Adpoc-geschützten Derivates erhalten wird. Oben: Essigsäure/Ameisensäure (83 % g/g)/Wasser 7:1:2, 40°C,2h; unten: 1 % TFA/CH_2Cl_2, 0°C, 90 Min , Emitterheizstrom 15 mA.

Durch Azidkupplung (2.5 N HCl in THF und tert.-Butylnitrit bei -30°C) wird nun Boc-Ala-Gly-Cys(Trt)-Lys(Boc)-Asn-Phe-Phe-$NHNH_2$ mit dem freigesetzten Amin zum geschützten Somatostatin umgesetzt (85 % Ausbeute mit 10 % Überschuß an Aminokomponente).



Syntheseschema 15 : Synthese des Somatostatins durch 7+7 Fragmentkondensation (Syntheseweg 3).

Die Anwesenheit der tert.-Butylgruppen (Boc und Bu^t) kann durch das ^{1}H-NMR-Spektrum gut gezeigt werden.

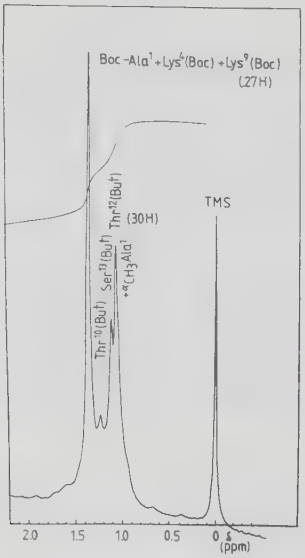


Abb. 43 : ^{1}H-PFT-NMR-Spektrum von Boc-Ala-Gly-Cys(Trt)-Lys(Boc)-Asn-Phe-Phe-Lys(Boc)-Thr(Bu^t)-Phe-Thr(Bu^t)-Ser(Bu^t)-Cys(Trt)-OH in Dimethylsulfoxid-d_6 (80 MHz).

Nach Kamber und Rittel wird das Tetradecapeptid mit Iod in Methanol/DMF 4:1 oxidativ cyclisiert. Dabei wird nach dem Ruggli-Ziegler-Verdünnungsprinzip vorgegangen und das Peptid in hoher Verdünnung in eine methanolische Jod-Lösung eingetropft; nach 30 Minuten ist dünnschichtchromatographisch nur noch ca. 10 % des Ausgangsmaterials vorhanden. Nach weiteren 30 Minuten wird bei 0°C mit 1 N Natriumthiosulfat überschüssiges Jod reduziert; in einem zweiten Versuch wird die Oxidation durch Zugabe einer Lösung von Ascorbinsäure abgestoppt. Letzterem Verfahren wird der Vorzug gegeben. Nach Entfernen des Triethylethers durch Verreiben des trockenen Produkts mit kaltem Hexan werden die restlichen Schutzgruppen durch 8-minütiges Behandeln mit stickstoffgesättigter, eiskalter Salzsäure entfernt. Die Lösung bleibt dabei vollkommen farblos. Das nach diesem Verfahren entstandene Produkt zeigt auf dem Dünnschichtchromatogramm neben einem Fleck nahe der Startlinie (Polymere ?) nur einen Hauptfleck.

Die anschließende Gelchromatographie auf einer G-25-Säule mit 2 N Essigsäure liefert 3 Fraktionen; die Aminosäureanalyse ergibt bei allen Fraktionen dem Somatostatin entsprechende Werte.

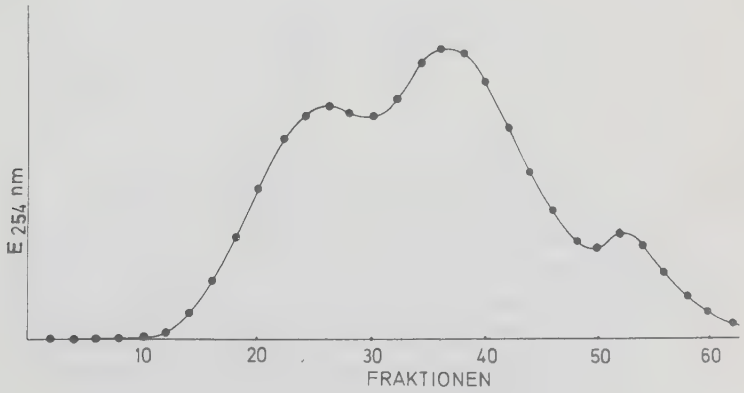


Abb. 44 : Gelchromatographie von rohem, cyclischem Somatostatin auf G 25 mit 2 N AcOH (Säule 80 x 0.6 cm, 2.8 ml Fraktionen, V_o = 59 ml).

Da geringe Mengen an reinem Somatostatin zur Verfügung stehen, werden die Fraktionen durch Hochdruckflüssigkeitschromatographie untersucht. Als mobile Phase hat sich das an Rivier [47] angelehnte System als günstig erwiesen. Acetonitril wird jedoch durch Isopropanol ersetzt.

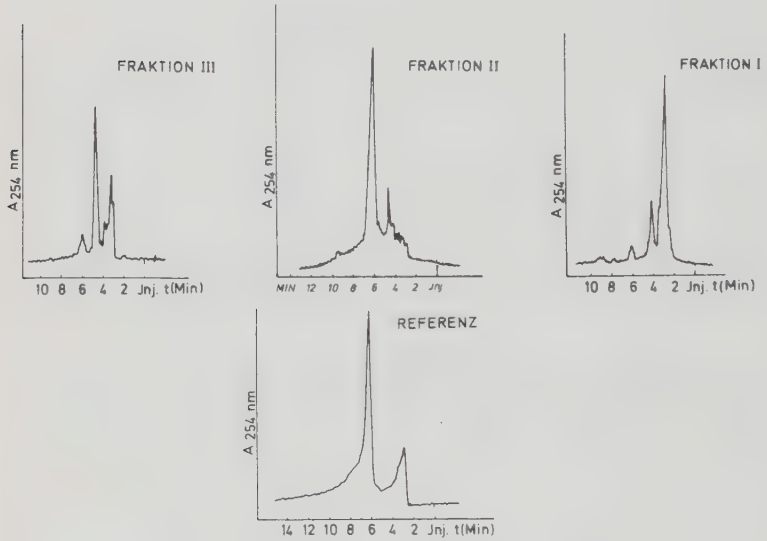


Abb. 45 : HPLC-Chromatogramm der an G 25 in 2 N AcOH erhaltenen Fraktionen von rohem, cyclischem Somatostatin.
Bedingungen: RP 8-Säule (25 cm x 0.46 cm, 1o µm). Mobile Phase: 35 % Isopropanol in 0,01 M NH_4Ac (pH 4.4); Durchflußrate: 1,5 ml/Min. bei 210 bar. UV-Absorption bei 254 nm.

Wie der Vergleich mit dem Referenzmaterial zeigt, sind in Fraktion II erhebliche Mengen an "retentionszeitgleicher" Verbindung. Fraktion I dürfte die bei der Oxydation entstandenen polymeren Anteile enthalten, Fraktion III enthält Substanzen unbekannter Natur, enthält jedoch ähnliche Aminosäurenzusammensetzung wie Fraktion II.

Zur Weiterreinigung werden zunächst 0.5 mg im semipräparativen Maßstab durch HPLC gereinigt, wobei jeweils 100 µg eingespritzt werden. Die entsprechenden Fraktionen werden direkt nach Ausgang aus der UV-Detektionszelle aufgefangen und gefriergetrocknet. Durch vergleichende Dünnschichtchromatographie in 7 verschiedenen Systemen kann volle Identität mit der Referenzsubstanz gezeigt werden. Die Ausbeute an Fraktion II beträgt nach nochmaliger Gelfiltration an G 25 3.9 mg = 24.2 %.

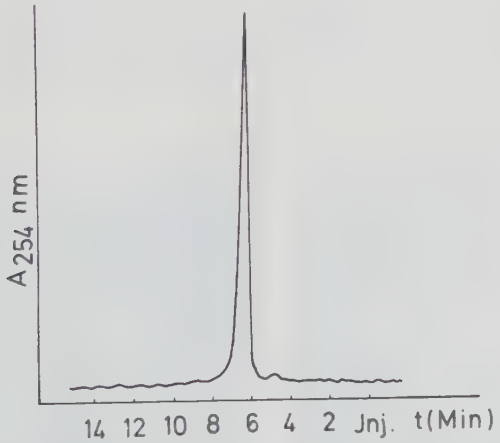


Abb. 46: HPLC-gereinigtes, cyclisches Somatostatin. Bedingungen: RP 8-Säule (25 x 0.46 cm, 10 µm Partikeldurchmesser); Mobile Phase: 35 % Isopropanol in 0.01 M MH_4Ac (pH 4.4). Durchflußrate 1.5 ml/Min bei 210 bar. UV Absorption bei 254 nm.

Ergebnis der Aminosäurenanalyse:

1. Hydrolyse mit 4 N Methansulfonsäure/ 0.2 % 3-(2-Aminoethyl)indol (22 h bei 115°C)
2. 6 N HCl 18 h bei 115°C

	Ala	Gly	Lys	Asp	Phe	Thr	Ser	Cys	Trp
Gef.1.	1.0	1.06	1.93	1.05	2.81	1.77	o.81	1.62	0.6
Gef.2.	1.0	1.00	1.12	1.05	3.00	1.87	0.5o	1.59	-
Ber.	1	1	2	1	3	2	1	2	1

Ergebnis des Racemattests:

Die Prüfung auf Racematanteile nach Zitat 150 ergibt folgende Werte:

Ala: 2.7 % ; Lys: 1.6 % ; Asp: 3.8 % ; Phe: 2.4 % ;
Thr: 0.39 % ; Ser: 3.4 % .

Um vergleichende Aussagen über die Leistungsfähigkeit der Abspaltungsmethoden nach Syntheseweg 2 bzw. 3 treffen zu können, werden die entstehenden Produkte lediglich durch 2-fache Gelchromatographie an G 25 gereinigt und dann dünnschichtchromatographisch untersucht.

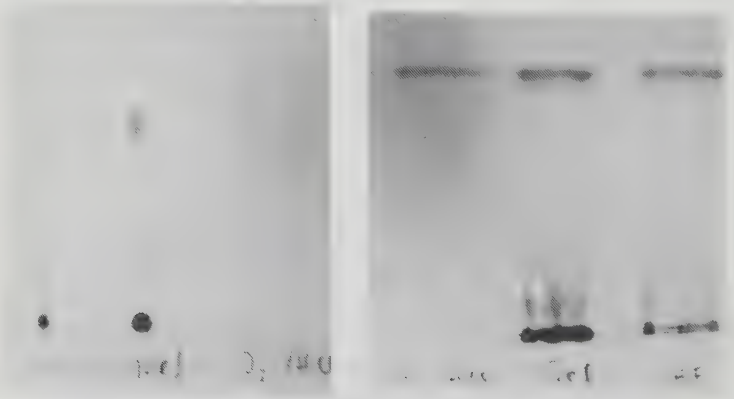


Abb. 47 : Dünnschichtchromatogramme des durch HF-Acidolyse (Syntheseweg 2) bzw. Iodoxidation mit anschl.Abspaltung mittels HCl (Syntheseweg 3) erhaltenen Proben an cyclischem Somatostatin. Kieselgelplatten 60 F 254.Anfärbung mit Ninhydrin. Links: n-Butanol/Pyridin/0.1 % Essigsäure 5:3:11 (Oberphase); rechts: Isopropanol/1N-Essigsäure 2:1

Sowohl das nach der HF-Hydrolyse hergestellte cyclische Somatostatin als auch die Referenzverbindung zeigen stark ninhydrinaktive Flecken polaren Ursprungs auf dem Startpunkt. Bei dem nach Syntheseweg 3 hergestellten Somatostatin wird dies nicht beobachtet.

Folgende Vorteile sprechen für den zuletzt eingeschlagenen Syntheseweg 3 :

1. Die höheren Peptide besitzen gute Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln.
2. Der Oxidationsschritt kann nach dem Ruggli-Ziegler-Prinzip vorgenommen werden. Polymere Anteile durch intermolekulare Oxidationen werden dabei vermindert gebildet.
3. Die Abspaltung der restlichen Schutzgruppen kann sehr einfach, schnell und weitgehend frei von Nebenprodukten durchgeführt werden.
4. Das anfallende Hydrochlorid des Somatostatins stellt die Form des Somatostatins dar, welche sich durch hohe Lagerungsbeständigkeit auszeichnet [145].

IV. EXPERIMENTELLER TEIL

A Spektroskopische Methoden

a) NMR-Spektroskopie: ^{1}H-NMR-Spektren wurden mit einem Varian A-60 A Spektrometer gemessen; die angegebenen ppm-Werte beziehen sich auf δ_{TMS} = 0.0 ppm.
Die Aufnahme der PFT-^{13}C $\{^{1}H\}$-NMR-Spektren erfolgte mit einem Bruker HFX-90-Multikern-NMR-Spektrometer (22.63 MHz für ^{13}C) durch Akkumulation von ^{13}C-Impulsinterferogrammen (Impulsbreite 2-3,5 µs; 0.4 sec/scan) und anschließender Fouriertransformation (BNC-28-Rechner) des akkumulierten Interferogramms. Ein Teil der Spektren wurde auch mit WP-80-NMR-Spektrometer (20.115 MHz) der Fa.Bruker aufgenommen.

b) IR-Spektren: Für die Aufnahme der IR-Spektren wurden KBr-Pressling hergestellt. Die Einwaage betrug 1.5 mg/300 mg KBr. Die Aufnahme erfolgte mit den Spektrographen 2021 und 021 der Fa.Perkin-Elmer, Überlingen.

c) Massenspektrometrie: Die Elektronenstoß-Massenspektren wurden mit dem Gerät MAT 711 der Fa.Varian, Bremen, gemessen.(Einlaßsystem direkt; Elektronenenergie 70 eV; Ionenquellentemperatur 230°C).
Die Felddesorptions-Massenspektren wurden mit einer FD-Ionenquelle desselben Gerätetyps Varian 711 aufgenommen. Die Auflösung betrug bei allen Messungen ungefähr 1000. Die jeweiligen Emitter-Heizströme für die optimale Anoden-Temperatur sind in den einzelnen FD-Massenspektren angegeben.

d) Drehwerte: Die Drehwerte wurden mit einem Zeiss OLD-5 Polarimeter bei 365,405,436,546 und 578 nm gemessen. Die $[\alpha]_D$-Werte wurden durch graphische Extrapolation ermittelt.

B Chromatographische Methoden

Alle dargestellten Verbindungen wurden mittels Dünnschichtchromatographie unter Verwendung von DC-Fertigplatten 60 F 254

der Fa.Merck auf Einheitlichkeit geprüft.

Folgende Fließmittelsysteme fanden Verwendung:
A: n-Butanol/Eisessig/Wasser, 3:1:1
B: Ohloroform/n/Hexan, 1:1
C: Chloroform/Benzol/Methanol, 1:1:1
D: Chloroform/Methanol/Benzol/Wasser, 40:40:40:5
E: Isopropanol/1 N Essigsäure, 2:1
F: Isopropanol/1 N NH_3, 1:1
G: Essigester/Pyridin/Wasser/Eisessig, 5:5:3:1.

Die Chromatogramme wurden mit Ninhydrinlösung [12o], Cl_2-Tolidin-Lösung [12o], Ehrlich-Reagens [13o] oder einem Schwefelsäure-Methanol (3:1)-Gemisch mit anschließendem Erwärmen auf 110°C entwickelt.

Gelchromatographische Trennungen wurden auf einer standardisierten Säule (80 x 2.6 cm) aus 100 g Sephadex LH 20 (Fa. Pharmacia, Uppsala) durchgeführt.(Säulenparameter: V_t: 42o ml, V_x: 124 ml, V_o: 296 ml). Es wurde ein Fraktionssammler Serva Linear II der Fa.Serva, Heidelberg mit nachgeschaltetem Durchflußphotometer (E_{254}nm) benutzt.

Für die Hochdruckflüssigkeitschromatographie wurde folgende Einheit zusammengestellt: Doppelkolben-Hochdruckpumpe M 6000 A der Fa.Waters Assoc.; Hochdruck-Injektionssystem Modell 7120 der Fa.Latek, Heidelberg; UV-Zweistrahlphotometer mit variabler Wellenlänge Uvicon LCD 725 der Fa.Kontron und elektronischer Integrator 3360 A der Fa. Hewlett — Packard.

Säulenfüllung: Die Trennsäule (Stahl, 250 x 4.6 mm) wurde nach einer modifizierten Viskositätsmethode gepackt: 3.0 g LiChrosorb RP 8 (10 µm, Fa.Merck) werden unter Rühren in 15 ml Toluol suspendiert und 2 Minuten mit Ultraschall behandelt. Dann gibt man zu dieser Suspension 20 ml Cyclohexanol und behandelt nochmals 5 Minuten mit Ultraschall. Die so vorbehandelte Suspension wird in das Füllrohr gegossen und das Säulenmaterial durch Pumpen von n-Hexan mit maximal erreichbarem Druck in die Trennsäule gepresst.

Die Zahl der theoretischen Böden wird nach der Formel $n = 5.54\ (t_R/W_{0.5})^2$ berechnet (t_R = Retentionszeit, $W_{0.5}$ = peakbreite in halber Höhe). Für Benzol hat die so hergestellte Säule eine theorethische Bodenzahl von 5400 (isokratische Elution: Methanol-Wasser, 95:5; 1.5 ml/Min mit t_R = 295 sec , $W_{0,5}$ = 9.4 sec).

C Sonstiges

Schmelzpunkte wurden auf einer Schmelzpunktbestimmungsapparatur nach Dr.Tottoli der Fa.Büchi, Flavil, Schweiz, bestimmt. Die angegebenen Schmelzpunkte sind nicht korrigiert.
Als pH-stat fand eine Gerätekombination der Fa.Metrohm (pH-Meter E 512 und Impulsomat E 473) Verwendung.

Die Aminosäurenanalysen wurden am Beckmann Unichrom Analysator bzw. einem automatischen Biotronik Chromatographie-System LC 6000 E durchgeführt.

D Chemikalien

Lösungsmittel wurden nach üblichen Vorschriften [108] getrocknet und anschließend über eine 140 cm Vigreux-Kolonne unter Feuchtigkeitsausschluß destilliert; sie wurden über Molekularsieben (Fa.Merck, 3 und 4 Å) aufbewahrt.

Sämtliche Aminosäuren wurden von der Fa.Merck bezogen und hatten ausschließlich - mit Ausnahme von Glycin - L-Konfiguration. Adamantan-1-carbonsäure wurde von der Fa.Senn Chemicals, Dielsdorf,Schweiz, bezogen.

Folgende Ausgangsverbindungen wurden nach Literaturangaben synthetisiert: tert.-Butyloxycarbonylazid wurde aus Carbazinsäure-tert.-butylester und Natriumnitrit in Eisessig[109] dargestellt. Benzyloxycarbonylchlorid wurde aus Benzylalkohol und Phosgen hergestellt [111]. Genaue Vorschriften finden sich in Zitat 112. Außerdem wurden synthetisiert: Boc-Ala-OH [112], Boc-Phe-OH[112], H-Phe-OCH_3.HCl[113] und Boc-Asn-OH[112].
Von trifunktionellen Aminosäuren wurden folgende Derivate hergestellt:

Boc-Thr(Bzl)-OH [114], H-Ser(Bzl)-OMe [115], H-Cys(Trt)-OH [38], Z-Lys(Boc)-OH [112] und H-Lys(Z)-OH [116].

H-Lys(Boc)-OH wurde wie üblich über den Lysin-Kupferkomplex mit Boc-N_3 hergestellt [117]. In Abänderung wurde nach Beendigung der Reaktion nur der größte Teil der Kupferionen mit EDTA-Natriumsalz komplexometrisch entfernt, restliche Kupferionen wurden konventionell durch Einleiten von H_2S-Gas entfernt [118]. Auf diese Weise erhält man ein völlig farbloses, in guten Ausbeuten zugängliches Produkt.

1-Hydroxybenzotriazol wurde nach [63] hergestellt.

2. Herstellung von 1-(1-Adamantyl)-1-methylethoxycarbonyl-Aminosäuren

2.1. Adamantan-carbonsäure-(1)-ethylester

50.0 (0.277 Mol) Adamantancarbonsäure-(1) werden in einem 1 l Kolben mit Magnetrührer und Rückflußkühler portionsweise mit insgesamt 70 g (0.336 Mol) Phosphorpentachlorid versetzt. Nach ungefähr einer Minute setzt die Reaktion unter stürmischer HCl-Entwicklung und Verflüssigung des Reaktionsgemisches ein. Man erhitzt noch 1 Stunde auf dem Wasserbad und destilliert das gebildete $POCl_3$ im Hochvakuum bei 40°C Wasserbadtemperatur am Rotationsverdampfer ab. Das entstandene Säurechlorid wird mit Eiswasser gekühlt und tropfenweise mit 100 cm^3 absolutem Ethanol versetzt. Nach beendeter Zugabe erhitzt man noch 1 Stunde auf dem Wasserbad und gießt nach dem Erkalten in 750 cm^3 Wasser. Nach 3-maliger Extraktion mit Ether wird die organische Phase mit 1 N Kaliumcarbonat-Lösung und Wasser gewaschen. Nach Trocknen über Natriumsulfat wird der Rückstand im Hochvakuum destilliert.

Ausbeute: 54.5 g (94.5 % d.Th.)
Kp.: 89-90°C (0.8 Torr), Lit.: 122-123°C (9 Torr) [120]
$C_{13}H_{20}O_2$ (208.3)

2.2. 2-(1-Adamantyl)-2-propanol

Zu der aus 85.5 g (0.6 Mol) Methyljodid und 14.5 g (0.6 Mol) Magnesium wie üblich hergestellten etherischen Lösung des Grignardreagenses werden innerhalb von 2 Stunden eine Lösung von 48 g (0.23 Mol) Adamantan-carbonsäure-(1)-ethylester in 150 cm^3 Ether zugetropft. Nach beendeter Zugabe wird noch 2 Stunden auf dem Wasserbad erhitzt und die Reaktionslösung nach Erkalten durch Eingießen in 1 Liter Eiswasser und Zugabe einer konz. Ammoniumchloridlösung hydrolysiert. Nach 3-maliger Extraktion mit Ether wird die organische Phase mit wenig Natriumhydrogensulfit, dann mit Wasser gewaschen. Nach Trocknen über Natriumsulfat

wird ganz eingeengt und der Rückstand über eine kurze Kolonne destilliert. Man erhält 43.0 g (96.2 % d.Th.), Kp. 118°C (0.5 mm). Umkristallisation aus absol.Ether bei -40°C oder 90 % Methanol liefert ein farbloses, mit langen Nadeln kristallisierendes Produkt.

Ausbeute nach Kristallisation: 37.4 g (83.6 % d.Th.)
Fp.: 76-77°C, Lit. 78-80°C [102]

$C_{13}H_{22}O$ (194.32) Ber: C 80.35 H 11.41
Gef: C 80.07 H 11.34

2.3. Adpoc-OPh als Einführungsreagens

[2-Adamantyl(1)-propyl(2)-phenyl-carbonat](Adpoc-OPh)

19.4 g (0.1 Mol) 2-Adamantyl(1)- propanol(2), 100 ml Dichlormethan und 12.0 ml Pyridin werden bei -5°C innerhalb 30 Minuten mit einer Lösung von 15.2 ml Chlorameisensäurephenylester in 50 ml Dichlormethan versetzt. Die während des Zutropfens gebildete Fällung geht nach Rühren über Nacht bei 0°C wieder in Lösung. Man gießt das Reaktionsgemisch auf Eis, verdünnt mit 150 ml Dichlormethan und trennt die organische Phase ab. Nach 3-maligem Waschen mit Wasser wird über Natriumsulfat getrocknet und bei 30° im Vakuum verdampft. Durch 2-malige Umkristallisation aus Benzol/n-Hexan werden lange, farblose Kristalle erhalten.

Ausbeute: 26.25 g (83.5 %)
Fp.: 72°C

$C_{20}H_{26}O_3$ (314.43) Ber: C 76.40 H 8.33
Gef: C 76.55 H 8.43

2.4. Herstellung der Adpoc-Aminosäuren über das Adpoc-Phenylcarbonat

10 mMol der Aminosäure werden unter gelindem Erwärmen in 4.6 cm^3 einer ca. 40%igen Lösung von Triton B in Methanol gelöst. Nach Verdampfen des Lösungsmittels wird der

Rückstand durch 2-malige azeotrope Destillation mit je 30 ml Dimethylformamid vom Wasser befreit. Der Rückstand wird bei 50°C in 30 ml Dimethylformamid aufgenommen, mit 3.8 g (12 mMol) Adpoc-OPh versetzt und die Reaktionsmischung 3 Stunden bei 50°C gerührt. Zur Aufarbeitung wird zwischen Wasser und Diethylether/Petrolether (1:1) verteilt, die abgetrennte wässrige Phase bei 0°C mit 1 N Zitronensäurelösung angesäuert (pH 2-3) und mit Diethylether erschöpfend extrahiert. Nach üblichem Waschen und Trocknen der Etherauszüge wird im Vakuum zur Trockene eingedampft. Der verbleibende Rückstand wird entweder direkt oder nach Überführen in das DCHA-Salz zur Kristallisation gebracht.

2.5. Adpoc-F als Einführungsreagens

Fluorameisensäure-2-adamantyl(1)-propyl(2)-ester(Adpoc-F)

Zu 19.4 g (0.1 Mol) 2-Adamantyl(1)-propanol(2) in 150 ml trockenem Ether und 14 ml Triethylamin wird im Laufe von 2-3 Stunden trockenes, SO_3-freies Carbonylchloridfluorid (aus 60 g 65%igem Oleum und 25 ml Fluorotrichloromethan gewonnen) bei -40° direkt einkondensiert. Hierbei fällt Triethylaminhydrochlorid aus. Nach Beendigung der Gasentwicklung beläßt man das Gemisch über Nacht bei -20°, danach wird bei 200 Torr und 10° entgast. Nach Filtration wird der Rückstand auf dem Filter mit trockenem Ether nachgewaschen. Das Filtrat enthält 22.9 g Adpoc-F. Es kann sowohl in etherischer Lösung oder direkt nach Einengen im Vakuum eingesetzt werden. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum kann der Fluorameisensäureester in kristalliner Form gewonnen werden.

Bei dieser Umsetzungsmethode kann IR-spektroskopisch kein Carbinol mehr nachgewiesen werden.

Ausbeute: 22.9 g (95 %)
Fp.: 52°C

$C_{14}H_{21}O_2F$ (240.32) Ber: C 69.9 H 8.81
Gef: C 70.25 H 8.99

2.6. Herstellung der Adpoc-Aminosäuren über das Adpoc-F

10 mMol der Aminosäure werden unter Erwärmen in 4.5 cm^3 ca. 40%iger Lösung von Triton B in Methanol gelöst. Man dampft im Vakuum ein, nimmt den Rückstand in 5-1o cm^3 Dimethylformamid auf, dampft wiederum ein und wiederholt den Vorgang. Nun löst man in 10 cm^3 Dimethylformamid, kühlt auf -10^o ab und versetzt bei dieser Temperatur mit 2.65 g (11 mMol) Adpoc-F und 1.6 cm^3 Triethylamin. Man rührt 3 Stunden bei -5^oC, 2 Stunden bei 0^oC, läßt auf Raumtemperatur kommen und gießt die Reaktionslösung in 20 cm^3 Eiswasser. Nach 2-facher Extraktion mit je 20 ml Ether-Petrolether (1:1) wird die wässrige Phase mit Zitronensäure angesäuert und mehrfach mit insgesamt 80 cm^3 Ether extrahiert. Die vereinigten org. Auszüge werden mit Wasser neutral gewaschen und der Ether nach kurzem Trocknen über Na_2SO_4 im Vakuum abdestilliert. Der Rückstand wird entweder direkt oder nach Überführen in das DCHA-Salz zur Kristallisation gebracht.

Eine Tabelle der Adpoc-Aminosäuren findet sich auf Seite 55.

2.7. Adpoc-ON als Einführungsreagens 2-(Hydroxyimino)-2-phenylacetonitril

In eine eisgekühlte Lösung von 58.5 g (0.5 Mol) Benzylcyanid und 20.0 g (0.5 Mol) Natriumhydroxid in 150 ml Methanol wird gasförmiges Methylnitrit eingeleitet. Dieses wird separat durch Eintropfen einer Mischung von 16 ml konz.Schwefelsäure und 33 ml Wasser in eine Suspension von 41.4 g (0.7 Mol) Natriumnitrit in 26.5 g Methanol und 25 ml Wasser hergestellt. Man rührt 2 Stunden bei Raumtemperatur und engt dann bis zur Trockene ein. Der Rückstand wird in Wasser aufgenommen und 2 mal mit Toluol gewaschen. Die wässrige Phase wird nun vorsichtig mit konz. Salzsäure versetzt, wobei ein leicht gelbstichiges Produkt ausfällt.

Ausbeute: 61 g (83 %)
Fp.: 127-129°, Lit. 119-124°C [128]
Rf: 0.47 (Chloroform/Methanol 9:1)

$C_8H_6N_2O$ (146.14) Ber: C 65.75 H 4.14 N 19.16
Gef: C 65.14 H 3.76 N 18.78

2.8. 2-[1-(1-Adamantyl)-1-methylethoxycarbonyloxiimino]-2-phenylacetonitril (Adpoc-ON)

Zu einer Lösung von Phosgen in Toluol (8.7 g einer 25%-Lösung) wird bei 0-5°C eine Lösung von 2.92 g (2o mMol) von 2-(Hydroxiimino)-1-phenylacetonitril, 2.4 g (20 mMol) Dimethylanilin und 1 ml Dioxan in 20 ml Benzol langsam zugetropft. Nach einer Stunde Rühren in der Kälte läßt man über Nacht bei Raumtemperatur stehen. Zu der erhaltenen Reaktionsmischung wird nun bei 0°C eine Lösung von 4.23 g (22 mMol) 2-(1-Adamantyl)-2-propanol und 3.2 ml Pyridin in 10 ml Benzol zugegeben. Man rührt 3 Stunden bei 0°C, dann über Nacht bei Raumtemperatur. Die Mischung wird in 50 ml Toluol aufgenommen, mit Wasser, 2 N Zitronensäure, Wasser, 5 % Natriumhydrogencarbonatlösung und wiederum mit Wasser gewaschen und anschließend über Natriumsulfat getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wird zweimal aus Methanol umkristallisiert.

Ausbeute: 3.5 g (47 % d.Th.)
Fp.: 100-101°C
Rf: 0.78 (Chloroform)

$C_{22}H_{26}N_2O_3$ (366.46) Ber: C 72.10 H 7.15 N 7.64
Gef: C 71.69 H 6.95 N 7.99

2.9. Einführung der Adpoc-Gruppe in Aminosäuren mittels Adpoc-ON

Zu einer Lösung von 1.02 g (5 mMol) Tryptophan und 1.05 ml Triethylamin (7.5 mMol) in 5 ml Wasser werden 5 ml Dioxan

und 2.01 g (5.5 mMol) kristallines Adpoc-ON bei Raumtemperatur zugegeben. Nach 1 Stunde Rühren wird die Reaktionsmischung klar; nach weiteren 4 Stunden wird zwischen Hexan und Wasser verteilt. Nach Ansäuern der wässrigen Phase mit 2 N Zitronensäure wird 3 mal mit Ether extrahiert. Die Auszüge werden neutral gewaschen, getrocknet und filtriert. Nach Einengen der Lösung wird zweimal aus Ether/Petrolether umkristallisiert. Man erhält ein völlig farbloses Produkt.

Ausbeute: 1.76 g (83 % d.Th.)
Fp.: 115-116°C
Rf_D: 0.48

$[\alpha]_D^{23}$: -6.8° (c = 1, MeOH)
$C_{25}H_{32}N_2O_4$ (424.54) Ber: C 70.73 H 7.60 N 6.60
Gef: C 70.48 H 7.51 N 6.53

3. Herstellung von 2-Benzyl-isopropyloxycarbonyl(Bzpoc)-Aminosäuren

3.1. Darstellung von Dimethyl-benzyl-carbinol (2-Benzyl-2-propanol)

Die Verbindung wird aus Benzylmagnesiumchlorid und Aceton nach Zitat 122 (Syntheseweg a) und durch Reaktion von Phenylessigsäureethylester mit Methylmagnesiumjodid nach Zitat 123 (Syntheseweg b) hergestellt. Nach fraktionierter Destillation (77°C/1 Torr) erhält man ein farbloses Öl, das bei längerem Stehen bei 0°C zu langen Nadeln erstarrt.

Ausbeute für Weg a): 81 % d.Th., für Weg b): 79 % d.Th.
Fp.: 20°C
n_D: 1.5151
Rf_B: 0.2

$C_{10}H_{14}O$ (150.2) Ber: C 75.79 H 8.89
Gef: C 76.01 H 9.12

3.2. Darstellung von [2-Benzyl-propyl-(2)]-phenylcarbonat

48 g (0.32 Mol) 2-Benzyl-2-propanol, 300 ml Methylenchlorid und 40 ml Pyridin werden bei -5°C innerhalb 30 Minuten mit einer Lösung von 49 ml Chlorameisensäurephenylester in 180 ml Methylenchlorid versetzt. Nach ca. 1/2 Stunde fällt ein dicker Niederschlag aus, der sich nach Rühren bei 0°C über Nacht wieder löst. Das Reaktionsgemisch wird auf wenig Eis gegossen, nach Verdünnen mit 300 ml Dichlormethan wird die organische Phase abgetrennt, dreimal mit Wasser gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Nach vorsichtigem Eindampfen bei 30°C Badtemperatur verbleibt ein öliger, schwach rötlicher Rückstand. Aus Ether/Petrolether (30-50) erhält man bei -20°C farblose, lange Nadeln.

Ausbeute: 71 g (82 % d.Th.)
Fp.: 58-59°C, nach weiterem Umkristallisieren 61°C
Rf_D: 0.91, Rf_B: 0.43

$C_{17}H_{18}O_3$ (270.33) Ber: C 75.53 H 6.71
Gef: C 75.90 H 6.88

3.3. Einführung der 2-Benzyl-isopropyl-Gruppe (Bzpoc-) in Aminosäuren

0.44 g (5 mMol) Alanin werden in 2.3 ml Benzyltrimethylammoniumhydroxidlösung (Triton B, 40 % in Methanol) bei 50°C gelöst. Nach Verdampfen des Lösungsmittels im Vakuum wird der Rückstand zur Entfernung von Wasser 2-mal mit je 10 ml Dimethylformamid destilliert. Der so erhaltene Rückstand wird bei 50°C in 10 ml Dimethylformamid gelöst, mit 1.28 g (5 mMol) Bzpoc-phenylcarbonat versetzt und 3 Stunden gerührt. Man verteilt zwischen Wasser und Diethylether und bringt die wässrige Phase bei 0°C auf einen pH von 3 und extrahiert erschöpfend mit Diethylether. Die vereinigten organischen Phasen werden mit Wasser gewaschen und schließlich über Natriumsulfat getrocknet. Nach Entfernen des

Lösungsmittels bei 30°C im Vakuum wird der Rückstand in Ether/Petrolether gelöst, mit 1 ml Dicyclohexylamin versetzt und bei 0°C auskristallisiert.

Ausbeute: 1.84 g (82 % d.Th.)
Fp.: 125-127°C
Rf_D: 0.57
$[\alpha]_D^{22}$: -15° (c = 1.6, MeOH)

$C_{26}H_{42}N_2O_4$ (446.63) Ber: C 69.92 H 9.47 N 6.27
Gef: C 69.61 H 9.57 N 6.06

Eine Tabelle ausgewählter Bzpoc-Aminosäuren findet sich auf Seite 44.

4. Synthese von Somatostatin

4.1. Fragment 1-7:Boc-L-Ala-Gly-L-Cys(Trt)-L-Lys(Boc)-L-Asn-L-Phe-L-Phe-NH-NH_2

4.1.1. N-tert.-Butyloxycarbonyl-L-alanin-hydroxysuccinimidester (Boc-L-Ala-OSu)

18.92 g (0.1 Mol) Boc-L-Ala-OH werden in 70 ml Ethylenglycoldimethylether gelöst und mit 11.51 g (0.1 Mol) N-Hydroxysuccinimid versetzt. Nach vollständigem Lösen der Komponenten kühlt man in Aceton-Trockeneis auf -40°C ab. Bei dieser Temperatur werden 20.63 g (0.1 Mol) Dicyclohexylcarbodiimid, gelöst in wenig Ethylenglycoldimethylether, zugefügt; man rührt eine Stunde in der Kälte, anschließend über Nacht bei Raumtemperatur. Der N-N'-Dicyclohexylharnstoff wird bei 0°C abfiltriert, mit kaltem Tetrahydrofuran gewaschen und das Filtrat im Vakuum vom Lösungsmittel befreit. Zweimalige Umkristallisation aus trockenem Isopropanol ergibt farblose Kristalle mit wesentlich höherem Schmelzpunkt als die Originalliteratur.

Ausbeute: 19.6 g (68,6 % d.Th.)
Fp.: 165°C (Zers.), Lit. 143-144°C [124]

Rf_A: 0.79, Rf_D: 0.72

$[\alpha]_D^{25}$: -44.2° (c = 1, Dioxan)

$C_{12}H_{18}O_6N_2$ (286.28) Ber: C 50.34 H 6.34 N 9.79
Gef: C 50.55 H 6.43 N 9.69

4.1.2. N-tert.-Butyloxycarbonyl-L-alanyl-glycin (Boc-L-Ala-Gly-OH)

2.47 g (0.033 Mol) H-Gly-OH und 3.50 g (0.033 Mol) Natriumcarbonat werden in 40 ml Wasser vollständig gelöst und in eine Lösung von 8.59 g (0.03 Mol) Boc-L-Ala-OSu in 50 ml Dimethylformamid eingerührt. Nach vierstündigem Rühren bei Raumtemperatur wird die Lösung auf 30 ml eingeengt, mit 100 ml Wasser versetzt und durch vorsichtige Zugabe von 1 N Salzsäure auf einen pH von 3 gebracht. Nach Einengen auf die Hälfte des Volumens wird die Wasserphase mit Kochsalz gesättigt und dann mit Essigester ausgeschüttelt. Die organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet und das Produkt aus Essigester/Ether ausgefällt.

Ausbeute: 6.8 g (92 % d.Th.)
Fp.: 116-118°C
Rf_A: 0.61, Rf_D: 0.24

$[\alpha]_D^{25}$: -9.1° (c=1, DMF)
$C_{10}H_{18}O_5N_2$ (246.27) Ber: C 48.47 H 7.37 N 11.37
Gef: C 48.99 H 7.24 N 11.42

4.1.3. S-Trityl-L-cysteinmethylester (Hydrochlorid) (H-L-Cys(Trt)-OMe.HCl) [125]

34.33 g (0.20 Mol) Cysteinmethylester (Hydrochlorid) und 70 g Triphenylmethylchlorid (0.25 Mol) werden in 150 ml Dimethylformamid/Chloroform (9:1) vollständig gelöst und bei 30°C 24 Stunden lang gerührt. Man versetzt mit 1.5 l

Ether und trennt das entstandene Öl im Scheidetrichter ab. Nach Zugabe von 160 ml gesättigter Kaliumbicarbonatlösung werden 900 ml Ether zugegossen und die Etherphase abgetrennt. Man wäscht einmal mit Wasser und trocknet anschließend über Natriumsulfat. Nach Hinzufügen von 40 ml von mit Salzsäuregas gesättigtem Ether destilliert man bei 35°C ab. Nach gründlichem Trocknen bei 10^{-1} Torr und 40°C Wasserbadtemperatur erhält man ein feines, rosafarbenes Produkt.

Ausbeute: 64 g (77.3 % d.Th.)
Fp.: 97-103°C
Rf_A: 0.65, Rf_D: 0.76

$[\alpha]_D^{25}$: = + 20.9°(c=1, DMF)
$C_{23}H_{24}N\,O_2S\,Cl$ (413.99) Ber: C 66.73 H 5.84 N 3.38 Cl 8.56 S 7.74
Gef: C 66.54 H 5.72 N 3.42 Cl 8.29 S 7.49

4.1.4. N-tert.-Butyloxycarbonyl-L-alanyl-glycyl-S-trityl-cysteinmethylester (Boc-L-Ala-Gly-L-Cys(Trt)-OMe)

5.17 g (0.021 Mol) N-tert.-Butyloxycarbonyl-L-alanyl-glycin und 8.18 g (0.02 Mol) S-trityl-cysteinmethylester (Hydrochlorid) werden in 80 ml Dimethylformamid gelöst, mit 2.84 g (0.021 Mol) 1-Hydroxybenzotriazol und 2.30 g (0.02 Mol) N-Ethylmorpholin versetzt und auf -10°C gekühlt. Nach 10 Minuten fügt man eine vorgekühlte Lösung von 4.33 g (0.021 Mol) Dicyclohexylcarbodiimid, gelöst in wenig DMF, zu. Nach 1 Stunde Rühren in der Kälte und 12 Stunden bei Raumtemperatur filtriert man den entstandenen N-N'-Dicyclohexylharnstoff bei 0°C ab und entfernt das Lösungsmittel im Vakuum. Der ölige Rückstand wird in Essigester aufgenommen, mehrmals basisch und sauer gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Aus Methylenchlorid/Petrolether erhält man lockere, nadelförmige Kristalle.

Ausbeute: 8.7 g (72 % d.Th.)
Fp.: 153°C
Rf_A: 0.81, Rf_D: 0.72

$[\alpha]_D^{23}$: + 8.2° (c = o.74, DMF)

$C_{33}H_{39}O_6S$ (605.75) Ber: C 65.43 H 6.49 N 6.94 S 5.29
Gef: C 65.72 H 6.66 N 6.87 S 4.99

4.1.5. N-tert.-Butyloxycarbonyl-L-phenylalanly-L-phenylalaninmethylester (Boc-L-Phe-L-Phe-OMe)

29.1 g (0.11 Mol) Boc-L-Phe-OH und 21.6 g (0.1 Mol) L-Phe-OMe.HCl werden in 250 ml Dimethylformamid/Methylenchlorid (1:1) gelöst, mit 10.1 g (0.1 Mol) N-Ethylmorpholin und 14.17 g (0.11 Mol) 1-Hydroxybenzotriazol versetzt und auf -10°C gekühlt. Nach 10 Minuten werden 22.69 g (0.11 Mol) Dicyclohexylcarbodiimid, gelöst und vorgekühlt in DMF, zugegeben und eine Stunde in der Kälte, dann über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Der ausgefallene N-N'-Dicyclohexylharnstoff wird bei 0°C abfiltriert, das Lösungsmittel im Vakuum abgezogen und der ölige Rückstand in Essigester aufgenommen. Man wäscht dreimal mit gesättigter Natriumbicarbonatlösung, zweimal mit 2 N Zitronensäure und schließlich zweimal mit Wasser. Nach Trocknen über Natriumsulfat wird durch Zugabe von wenig Ether ausgefällt.

Ausbeute: 37.9 g (89 % d.Th.)
Fp.: 122-123°C
Rf_A: 0.80, Rf_D: 0.86

$[\alpha]_D^{25}$: -10.2° (c=1, DMF)

$C_{24}H_{30}N_2O_5$ (426.51) Ber: C 67.58 H 7.09 N 6.57
Gef: C 67.50 H 7.22 N 6.43

4.1.6. L-Phenylalanyl-L-phenylalanin-methylester(Hydrochlorid) (L-Phe-L-Phe-OMe.HCl)

21.33 g (0.05 Mol) Boc-L-Phe-L-Phe-OMe werden mit 160 ml 1.2 N HCl/Eisessig versetzt und bei Raumtemperatur 25 Minuten gerührt. Danach wird im Vakuum zur Trockene eingeengt, mit Methanol dreimal nachextrahiert und das rückbleibende Öl in Chloroform gelöst. Durch Zugabe von wenig Ether erhält man feine, wattige Kristalle.

Ausbeute: 18.0 g (99 % d.Th.)
Fp.: 200-201°C
Rf_A: 0.57, Rf_D: 0.80

$[\alpha]_D^{25}$ = -10.2° (c=1, DMF)

$C_{19}H_{22}N_2O_3$ (362.85) Ber: C 62.89 H 6.11 N 7.72
Gef: C 62.99 H 6.17 N 7.89

4.1.7. N-tert.-Butyloxycarbonyl-L-asparaginyl-L-phenylalanyl-L-phenylalaninmethylester (Boc-L-Asn-L-Phe-L-Phe-OMe)

3.88 g (0.011 Mol) Boc-L-Asn-ONp [112] und 3.99 g (0.11 Mol) L-Phe-L-Phe-OMe.HCl werden in 50 ml Dimethylformamid vollständig gelöst, mit 1.1 g (0.011 Mol) Triethylamin versetzt und 6 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Man filtriert vom ausgefallenen Triethylammoniumchlorid ab und entfernt das DMF im Vakuum. Nach gründlichem Waschen mit je 250 ml Essigester und Chloroform wird aus Ethanol/Aceton bei -30°C gefällt. Nach Trocknen im Vakuum erhält man reine, farblose Kristalle.

Ausbeute: 4.9 g (84.3 % d.Th.)
Fp.: 194-195°C
Rf_A: 0.66, Rf_D: 0.71

$[\alpha]_D^{25}$:= -39.46° (c = o.9, DMF)

$C_{28}H_{36}N_4O_7$ (540.62) Ber: C 62.20 H 6.71 N 10.36
Gef: C 62.01 H 6.61 N 10.47

4.1.8. L-Asparaginyl-L-phenylalanyl-L-phenylalaninmethylester (Hydrochlorid) (H-L-Asn-L-Phe-L-Phe-L-Phe-OMe.HCl)

3.9 g (0.0072 Mol) Boc-L-Asn-L-Phe-L-Phe-OMe werden mit 20 ml 1.2 N HCl/Eisessig gelöst. Nach 30 Minuten wird im Vakuum abgezogen, dreimal mit Methanol extrahiert und der feste Rückstand in Methanol umkristallisiert. Die entstandene Substanz ist dünnschichtchromatographisch völlig einheitlich.

Ausbeute: 3.4 g (98.9 % d.Th.)
Fp.: 184-185°C
Rf_A: 0.42
$[\alpha]_D^{25}$: -38.0° (c=0.9, DMF)
$C_{23}H_{28}N_4O_5$ (476.95) Ber: C 57.92 H 5.91 N 11.75
Gef: C 57.77 H 5.88 N 11.84

4.1.9. N^{α}-Benzyloxycarbonyl-N^{ε}-tert.-butyloxycarbonyl-L-lysin-N-hydroxyxuccinimidester (Z-L-Lys(Boc)-OSu)

10.7 g (0.028 Mol) des öligen Produktes Z-L-Lys(Boc)-OH[117,118] werden in 150 ml Ethylenglycoldimethylether gelöst, mit 3.55 g (0.0308 Mol) N-Hydroxysuccinimid versetzt und mittels Trockeneis/Aceton auf -50°C gekühlt. Nach Hinzufügen von 6.3 g (0.0308 Mol) Dicyclohexylcarbodiimid, gelöst in wenig Ethylenglycoldimethylether, wird nach 2 Stunden in der Kälte, dann über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Nach Abfiltrieren des N-N'-Dicyclohexylharnstoffs bei 0°C wird das Filtrat eingeengt, in Essigester aufgenommen und mit Diethylether/Diisopropylether gefällt.

Ausbeute: 9.9 g (74.1 % d.Th.)
Fp.: 96-97°C, Lit. 96-98°C [149]
Rf_A: 0.79, Rf_D: 0.80
$[\alpha]_D^{25}$: -17.0° (c=2, Dioxan), Lit. $[\alpha]_D^{25}$: -15.9° (c=3.5, Dioxan)
$C_{28}H_{31}N_3$ (477.29) Ber: C 70.46 H 6.55 N 8.80
Gef: C 70.76 H 6.72 N 8.86

4.1.10. N^{α}-Benzyloxycarbonyl-N^{ε}-tert.-butyloxycarbonyl-L-lysyl-L-asparaginyl-L-phenylalanyl-L-phenylalanin-methylester (Z-L-Lys(Boc)-L-Asn-L-Phe-L-Phe-OMe)

2.75 g (0.0057 Mol) L-Asn-L-Phe-L-Phe-OMe.HCl und 2.75 g (0.0057 Mol) Z-L-Lys(Boc)-OSu werden in 40 ml Dimethylformamid vollständig gelöst, mit 0.58 g (0.0057 Mol) Triethylamin versetzt und 6 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Man filtriert von ausgefallenem Triethylammoniumchlorid ab und entfernt das DMF im Vakuum. Der feste Rückstand wird mit je 200 ml Essigester und 200 ml Chloroform gewaschen und schließlich aus warmem Methanol umkristallisiert.

Ausbeute: 2.8 g (60 % d.Th.)
Fp.: 209°C (Zers.)
Rf_A: 0.85

$[\alpha]_D^{25}$: -30.55° (c=1.03,DMF)

$C_{42}H_{54}N_6O_9$ (802.93) Ber: C 62.83 H 6.78 N 10.46
ber: C 63.21 H 6.93 N 10.25

4.1.11. N-tert.-Butyloxycarbonyl-L-alanyl-glycyl-S-trityl-L-cystein (Boc-L-Ala-Gly-L-Cys(Trt)-OH)

5.45 g (9 mMol) Boc-L-Ala-Gly-L-Cys(Trt)-OMe werden in 50 ml Methanol gelöst und am pH-Stat bei pH 13 mit 1 N NaOH verseift. (Verbrauch an 1 N NaOH: 9.1 ml. Verseifungsdauer: 2 Stunden). Nach beendeter Reaktion stellt man mit 1 N HCl auf pH 7 ein, engt weitgehend im Vakuum ein und nimmt den Rückstand in 100 ml Essigester/Ether (1:1) auf. Mit Hilfe von 2 N Zitronensäure wird nun ein pH von 2-3 eingestellt, die wässrige Phase abgetrennt und die organische Phase dreimal mit Kochsalz gesättigtem Wasser gewaschen. Nach Trocknen über Natriumsulfat wird im Vakuum ganz eingeengt. Man erhält einen leicht rosafarbenen, öligen Rückstand, der nach Trocknen bei 10^{-2} Torr mit Ether verrieben wird. Zur Hochreinigung wird an 250 g Kieselgel mit Chloro-

form-Methanol (9:1) chromatographiert. Nach Vorlauf eines lipophilen Produkts(Rf_C: 0.63) werden die folgenden Chlor-Tolidin-positiven Fraktionen gesammelt, eingeengt und aus Essigester/Ether/Petrolether kristallisiert.

Ausbeute: 4.17 g (78.1 % d.Th.)
Fp.: 160°C (Zers.)
Rf_D: 0.53
$[\alpha]_D^{20}$: + 8.4° (c=0.9, DMF)

$C_{32}H_{37}N_3O_6S$ (593.74 Ber: C 63.73 H 6.28 N 7.07 S 5.40
Gef: C 64.52 H 6.08 N 6.90 S 5.05

4.1.12. N -tert.-Butyloxycarbonyl-L-lysyl-L-asparaginyl-L-phenylalanyl-L-phenylalaninmethylester (H-L-Lys(Boc)-L-Asn-L-Phe-L-Phe-OMe)

8.0 g (0.1 Mol) Z-Lys(Boc)-Asn-Phe-Phe-OMe werden in 80 ml Dimethylformamid bei 40° gelöst, mit 1 g 10% Palladiumkohle versetzt und im Durchflußverfahren hydriert. Nach 6 Stunden wird für 15 Minuten Stickstoff durchgeleitet und mehrmals durch ein Aktivkohlefilter und Celite filtriert. Nach Einengen der Lösung bei 40°C/10^{-1} Torr verbleibt ein gallertartiger Rückstand, welcher aus DMF/Ether umkristallisiert wird.

Ausbeute: 4.83 g (72.22 % d.Th.)
Fp.: 204-205°C

$[\alpha]_D^{20}$: -38.4° (c=1, DMF)

$C_{34}H_{48}N_6O_8$ (668.79) Ber: C 61.06 H 8.14 N 12.56
Gef: C 60.59 H 8.02 N 12.37

4.1.13. N-tert.-Butyloxycarbonyl-L-alanyl-glycyl-S-trityl-L-cysteinyl-N^{ε}-tert.-butyloxycarbonyl-L-lysyl-L-asparaginyl-L-phenylalanyl-L-phenylalaninmethylester (Boc-L-Ala-Gly-L-Cys(Trt)-L-Lys(Boc)-L-Asn-L-Phe-L-Phe-OMe)

2.66 g (4.5 mMol) Boc-L-Ala-Gly-L-Cys(Trt)-OH und 2.96 g (4.2 mMol) H-L-Lys(Boc)-L-Asn-L-Phe-L-Phe-OMe werden in 50 ml Dimethylformamid gelöst, mit 0.61 g (4.5 mMol) HOBt versetzt und auf -10°C gekühlt. Nach 10 Minuten werden 0.93 g (4.5 mMol) DCC, gelöst und vorgekühlt in DMF, zugegeben und 1 Stunde in der Kälte, dann 18 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Der ausgefallene Dicyclohexylharnstoff wird bei 0°C abfiltriert, das Lösungsmittel im Vakuum abgezogen und der ölige Rückstand mit Tetrahydrofuran/Ether verrieben und abfiltriert. Nach zweimaligem Waschen mit jeweils 10-ml-Portionen Chloroform und Ether wird das Produkt über Sephadex LH 20 mit Methanol/Methylenchlorid (9:1) gereinigt. Es werden jeweils 3-ml-Fraktionen gesammelt. Die Fraktionen 45-33 enthalten eine schwach ninhydrinpositive und eine stark chlortolidinpositive Substanz, welche gesammelt und eingeengt werden.

Rohausbeute: 5.0 g, Ausbeute nach Säulenchromatographie: 2.9 g (55.6 % d.Th.)
Fp.: 190-192°C
Rf_A: 0.91, Rf_D: 0.67

$[\alpha]_D^{23}$: -20.4° (c=0.9, DMF)

$C_{66}H_{83}N_9O_{13}S$ (1242.46) Ber: C 63.80 H 6.73 N 10.14 S 2.58
Gef: C 64.01 H 6.85 N 10.02 S 2.73

Aminosäurenanalyse (6 N HCl, 115°C, 18 h)

	Ala	Gly	Cys	Asp	Phe	Lys
Ber:	1	1	1	1	2	1
Gef:	1.0	0.97	0.67	1.03	1.93	1.04

4.1.14. Darstellung von N-tert.-Butyloxycarbonyl-L-alanyl-glycyl-S-trityl-L-cysteinyl-N^{ε}-tert.-butyloxycarbonyl-L-lysyl-L-asparaginyl-L-phenylalanyl -L-phenylalaninhydrazid (Boc-L-Ala-Gly-L-Cys(Trt)-L-Lys(Boc)-L-Asn-L-Phe-L-Phe-NH-NH_2)

1.1 g (0.88 mMol) des Heptapeptidmethylesters werden in 3 ml DMF und 10 ml MeOH gelöst, mit 0.4 ml Hydrazinhydrat (100 %) versetzt und 48 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Der entstandene gallertartige Niederschlag wird abfiltriert, mit 40 % wässrigem Methanol und anschließend mit Ether nachgewaschen. Nach Trocknen im Hochvakuum verbleibt ein farbloses, amorphes Produkt (950 mg). Das Filtrat wird eingeengt, nochmals in 5 ml Methanol aufgenommen und mit 0.1 ml Hydrazinhydrat versetzt. Nach 18 Stunden wird wie oben aufgearbeitet. Es verbleibt ein farbloses bis leicht bräunliches Produkt (100 mg).

Ausbeute: 1050 mg (95.45 % d.Th.)

Rf_A: 0.68, Rf_D: 0.81

$[\alpha]_D^{23}$: -18.5° (c=0.9, DMF)

$C_{65}H_{83}N_{11}O_{12}S$ (1242.46 Ber: C 62.83 H 6.73 N 12.40 S 2.57
Gef: C 62.55 H 6.69 N 12.48 S 2.78

4.2. Synthese von Somatostatin, Syntheseweg 1

4.2.1. N^{α}-Benzyloxycarbonyl-L-tryptophan (Z-L-Trp-OH)

61.2 g (0.3 Mol) H-Trp-OH werden mit 56 g (0.33 Mol) Carbobenzoxychlorid und 2 N NaOH bei pH 9.0 carbobenzoxyliert. Das so entstandene ölige Produkt wird mit Ether verrieben und bei 0°C auskristallisiert.

Ausbeute: 80.2 g (79 % d.Th.)
Fp.: 128°C, Lit. 126°C [131]
Rf_A: 0.78, Rf_D: 0.68

$[\alpha]_D^{25}$: -7° (c=1, MeOH)

$C_{19}H_{18}N_2O_4$ (338.37) Ber: C 67.44 H 5.36 N 8.28
Gef: C 67.70 H 5.43 N 8.19

4.2.2. N^{α}-Benzyloxycarbonyl-L-tryptophan-N-hydroxysuccinimidester (Z-L-Trp-OSu)

61.2 g (0.3 Mol) Z-Trp-OH werden in einer Analogdarstellung zu Boc-L-Ala-OH zum Aktivester Z-Trp-OSu umgesetzt. Das so erhaltene bräunliche Öl konnte erstmals aus frisch destilliertem Isopropanol/Ethanol (9:1) kristallin erhalten werden.

Ausbeute: 10.7 g (81 % d.Th.)
Fp.: 74-76°C, Lit. Öl [124]
Rf_A: 0.76, Rf_D: 0.81

$[\alpha]_D^{25}$: -54.6° (c=1, DMF)
$C_{23}H_{21}N_3O_6$ (435.44) Ber: C 63.44 H 4.85 N 9.65
Gef: C 63.72 H 5.01 N 9.49

4.2.3. N^{α}-Benzyloxycarbonyl-L-tryptophyl-N^{ε}-tert.-butyloxycarbonyl-L-lysin (Z-L-Trp-L-Lys(Boc)-OH)

4.89 g (0.018 Mol) H-L-Lys(Boc)-OH und 1.96 g (0.018 Mol) Natriumcarbonat werden in 80 ml Wasser/Dimethylformamid

(9:1) vollständig gelöst und zu einer Lösung von 7.66 g (0.017 Mol) Z-L-Trp-OSu in 40 ml DMF zugegeben. Nach 2 Stunden Rühren bei Raumtemperatur engt man die Lösung bis auf 30 ml ein, überschichtet mit 80 ml Essigester und tropft unter starkem Rühren so lange 2 N Zitronensäure zu, bis sich ein pH von 5 stabilisiert hat. Nach zweimaliger Extraktion der mit Kochsalz gesättigten wässrigen Phase mit Essigester werden die organischen Phasen vereinigt und nochmals mit kochsalzgesättigtem Wasser gewaschen. Nach Trocknen der Essigesterphase mit Natriumsulfat zieht man im Vakuum ab. Das Produkt kann trotz vieler Kristallisationsversuche nicht kristallin erhalten werden.

Ausbeute: 6.44 g (67 % d.Th.)

Rf_A: 0.84, Rf_D: 0.41

$[\alpha]_D^{25}$: -12.2° (c=1.23, DMF)

$C_{30}H_{38}N_4O_7$ (566.66) Ber: C 63.59 H 6.76 N 9.89
Gef: C 63.78 H 6.88 N 9.84

4.2.4. N-tert.-Butyloxycarbonyl-O-benzyl-L-threonyl-L-phenylalaninmethylester (Boc-L-Thr(Bzl)-L-Phe-OMe)

4.02 g (0.013 Mol) Boc-L-Thr(Bzl)-OH [114] und 2.78 g (0.013 Mol) L-Phe-OMe·HCl [113] werden in 3o ml Dimethylformamid gelöst, mit 1.5 g (0.013 Mol) N-Ethylmorpholin und 1.76 g (0.013 Mol) 1-Hydroxybenzotriazol versetzt und auf -10°C gekühlt. Nach 10 Minuten fügt man eine vorgekühlte Lösung von 2.68 g (0.013 Mol) Dicyclohexylcarbodiimid in wenig DMF hinzu und läßt 1 Stunde in der Kälte, dann 12 Stunden bei Raumtemperatur rühren. Nach Abfiltrieren des N-N'-Dicyclohexylharnstoffs wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der ölige Rückstand in Essigester aufgenommen. Nach Waschen mit 2 N Zitronensäure und gesättigter Bicarbonatlösung wird über Natriumsulfat getrocknet, das Ethylacetat ganz abgezogen und aus Ethanol bei -30°C auskristallisiert. Dieses Verfahren liefert ein reines, granuliertes Produkt.

Ausbeute: 3.1 g (66 % d.Th.)
Fp.: 142°C
Rf_A: 0.86, Rf_D: 0.76

$[\alpha]_D^{25}$: + 7.5° (c=0.98, DMF)

$C_{26}H_{34}N_2O_6$ (470.59) Ber: C 66.36 H 7.28 N 5.95
Gef: C 66.21 H 7.17 N 6.13

4.2.5. N^{α}-Benzyloxycarbonyl-L-tryptophyl-N^{ε}-tert.-butyloxycarbonyl-L-lysyl-O-benzyl-L-threonyl-L-phenylalaninmethylester (Z-L-Trp-L-Lys(Boc)-L-Thr(Bzl)-L-Phe-OMe)

5.2 g (11.2 mMol) Boc-L-Thr(Bzl)-L-Phe-OMe werden mit 37 ml Trifluoressigsäure/Wasser (8:1) 45 Minuten lang bei Raumtemperatur gerührt. Danach wird im Vakuum abgezogen und mehrmals mit MeOH nachextrahiert. Das entstandene, schwach gelbliche, etherlösliche Öl gibt in beiden Laufmittelsystemen einen einheitlichen Ninhydrin- und Chlor-Tolidin-positiven Fleck (Rf_A: 0.52, Rf_D: 0.76). Nach Hochvakuumtrocknung über Kaliumhydroxid wird es zusammen mit 6.80 g (12 mMol) Z-L-Trp-L-Lys(Boc)-OH in 60 ml Dimethylformamid/Methylenchlorid 1:1 gelöst, mit 1.40 g (12 mMol) N-Ethylmorpholin und 1.62 g (12 mMol) HOBt versetzt und auf -10°C gekühlt. Nach 10 Minuten werden 2.47 g (12 mMol) DCC, gelöst und vorgekühlt in wenig DMF zugegeben, und eine Stunde in der Kälte, dann 18 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach Filtration bei 0°C und nach Entfernen der Lösungsmittel wird das entstandene Öl in Essigester aufgenommen. Das Filtrat wird wie üblich sauer (2 N Zitronensäure) und basisch (Natriumbicarbonat 5 %) und schließlich mit Wasser neutral gewaschen. Nach Trocknen über Natriumsulfat fällt nach 12 Stunden Stehen bei 0°C ein farbloser Niederschlag aus, der mit viel Ether nachgewaschen und getrocknet wird.

Ausbeute: 6.2 g (67.5 % d.Th.)
Fp.: 196-198°C
Rf_D: 0.74

$[\alpha]_D^{23}$: -3.4° (c=0.9, DMF)

$C_{51}H_{62}N_6O_{10}$ (919.10) Ber: C 66.64 H 6.80 N 9.14
Gef: C 66.85 H 6.89 N 8.99

4.2.6. Darstellung von L-Tryptophyl-N^{ε}-tert.-butyloxycarbonyl-L-lysyl-O-benzyl-L-threonyl-L-phenylalaninmethylester (H-L-Trp-L-Lys(Boc)-L-Thr(Bzl)-L-Phe-OMe)

1 g (1.1 mMol) des carbobenzoxygeschützten Produkts werden in 40 ml Dimethylformamid gelöst, mit 40 ml absolutem Toluol/Methanol (1:1) versetzt und mit 200 mg Palladium (10%)/Kohle im Durchflußverfahren hydriert. Nach 6 Stunden leitet man 15 Minuten Stickstoff durch die Lösung und filtriert mehrmals durch ein Aktivkohlefilter. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wird aus Methanol/Ether auskristallisiert. Man erhält farblose, hygroskopische Kristalle.

Ausbeute: 805 mg (94.2 % d.Th.)
Fp.: 118-120°C; Zers.P.: 168°C, nach Säulenreinigung Sephadex LH 20, MeOH als Elutionsmittel, Fp.: 128-130°C
Rf_A: 0.77, Rf_D: 0.68

$C_{43}H_{56}N_6O_8$ (784.91) Ber: C 65.80 H 7.19 N 10.70
Gef: C 65.61 H 7.07 N 10.49

4.3. Sequenz 1-11

4.3.1. Darstellung von N-tert.-Butyloxycarbonyl-L-alanyl-glycyl-S-trityl-L-cysteinyl-N$^{\varepsilon}$-tert.-butyloxycarbonyl-L-lysyl-L-asparaginyl-L-phenylalanyl-L-phenylalanyl-L-tryptophyl-N$^{\varepsilon}$-tert.-butyloxycarbonyl-L-lysyl-O-benzyl-L-threonyl-L-phenylalaninmethylester (Boc-L-Ala-Gly-L-Cys(Trt)-L-Lys(Boc)-L-Asn-L-Phe-L-Phe-L-Trp-L-Lys(Boc)-L-Thr(Bzl)-L-Phe-OMe)

496.8 mg (0.4 mMol) des Heptapeptidhydrazids werden in 9 ml DMF gelöst und bei -40°C mit 64 µl Isoamylnitrit (0.48 mMol) und 444 µl (0.8 mMol) 1.8 N HCl/THF versetzt. Nach 30 Minuten Rühren bei dieser Temperatur werden 224 µl (0.8 mMol) Triethylamin und danach 345.5 mg H-L-Trp-L-Lys(Boc)-L-Thr(Bzl)-L-Phe-OMe zugegeben und eine Stunde wird in der Kälte (-25°C) gerührt. Nach 12 Stunden bei 0°C und 24 Stunden bei Raumtemperatur wird in Methanol/Wasser gegossen und vom ausgefallenen Produkt abfiltriert. Ein Teil des im Vakuum getrockneten Produkts (240 mg) wird über eine Sephadex-LH-20-Säule mit Methanol als Elutionsmittel gereinigt.

Ausbeute: 740 mg (92.7 % d.Th.)
Fp.: Rohprodukt: 215-217°C, LH-20-Prod: 233-235°C
Rf_A: 0.61, Rf_D: 0.73

$C_{103}H_{135}N_{15}O_{20}S$ (1995.37) Ber: C 65.01 H 6.82 N 10.52 S 1.60
Gef: C 64.79 H 6.89 N 10.32 S 1.87

Aminosäureanalyse:

	Ala	Gly	Cys	Lys	Asp	Phe	Thr
Ber:	1	1	1	2	1	3	1
Gef:	0.98	1.0	0.65	2.1	1.0	2.9	0.85

4.4. Fragment 12-14

4.4.1. N-tert.-Butyloxycarbonyl-O-benzyl-L-threonyl-O-benzyl-L-serinmethylester (Boc-L-Thr(Bzl)-L-Ser-(Bzl)-OMe)

4.9 g (0.016 Mol) Boc-L-Thr(Bzl)-OH und 3.89 g (0.016 Mol) H-L-Ser(Bzl)-OMe.HCl werden in 50 ml Dimethylformamid/Methylenchlorid (8:2) gelöst, mit 2.14 g (0.016 Mol) 1-Hydroxybenzotriazol und 1.8 g (0.016 Mol) N-Ethylmorpholin versetzt und auf -5°C gekühlt. Nach 10 Minuten fügt man 3.58 g (17.4 mMol) Dicyclohexylcarbodiimid, gelöst und vorgekühlt in wenig DMF, hinzu und läßt eine Stunde in der Kälte, anschließend 12 Stunden bei Raumtemperatur rühren. Nach Abfiltrieren des Dicyclohexylharnstoffs bei 0°C wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das so erhaltene Öl wird in Tetrachlorkohlenstoff aufgenommen, mit 2 N Zitronensäure und Natriumbicarbonatlösung gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Nach Abdestillieren der Lösungsmittel verbleibt ein hochviskoses Produkt, welches nicht kristallin erhalten werden kann und bei 10^{-1} Torr getrocknet wird.

Ausbeute: 5.15 g (64.7 % d.Th.)

Rf_A: 0.90, Rf_D: 0.85

$[\alpha]_D^{25}$: + 13.5° (c=1.1, DMF)

$C_{27}H_{36}N_2O_7$ (500.60) Ber: C 64.78 H 7.24 N 5.60
Gef: C 65.07 H 7.59 N 5.82

4.4.2. N-tert.-Butyloxycarbonyl-O-benzyl-L-threonyl-O-benzyl-L-serin-hydrazid (Boc-L-Thr(Bzl)-L-Ser(Bzl)-$NHNH_2$)

3.5 g (20 mMol) des Methylesters werden in 30 ml Methanol gelöst, mit 1 ml Hydrazinhydrat versetzt und bei Raumtemperatur 24 Stunden gerührt. Obwohl die Lösung klar bleibt, wird im Vakuum weitgehend eingeengt, in wenig Dimethylfor-

mamid aufgenommen und mit eiskaltem Wasser gefällt. Nach Stehenlassen bei 0°C kristallisiert das zunächst ölig anfallende Produkt aus. Es wird mit Wasser, dann mit Ether/Petrolether nachgewaschen und getrocknet.

Ausbeute: 3.3 g (94.2 % d.Th.)
Fp.: 108°C
Rf_D: 0.67

$[\alpha]_D^{20}$: + 9.3° (c= 0.9, DMF)

$C_{26}H_{36}N_4O_6$ (500.60) Ber: C 62.38 H 7.25 N 11.91
Gef: C 62.24 H 7.19 N 11.73

4.4.3. N-tert.-Butyloxycarbonyl-O-benzyl-L-threonyl-O-benzyl-L-seryl-S-trityl-L-cystein (Boc-L-Thr(Bzl)-L-Ser(Bzl)-L-Cys(Trt)-OH)

2.9 g (5.7 mMol) Boc-L-Thr(Bzl)-L-Ser(Bzl)-$NHNH_2$ werden in 20 ml Dimethylformamid gelöst und bei -30°C mit 8.9 ml 2.6 N HCl/THF und 0.88 ml (6.5 mMol) tert.-Butylnitrit versetzt. Nachdem der Hydrazidtest negativ ausfällt (5 Minuten), wird noch 5 Minuten weitergerührt, dann die Reaktion durch Zugabe von 3.22 ml (23 mMol) Triethylamin neutralisiert; danach werden 2.1 g H-Cys(Trt)-OH in 10 ml DMF/Pyridin/Wasser (2:2:1) zugegeben. Man rührt 2 Stunden bei -25°C, 18 Stunden bei 0°C, dann 18 Stunden bei Raumtemperatur. Nach Entfernen der Lösungsmittel im Vakuum wird in 100 ml Essigester aufgenommen, mit 2 N Zitronensäure, dann mehrmals mit kochsalzgesättigtem Wasser gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Der nach Eindampfen erhaltene ölige Rückstand wird an LH 20 mit Methanol chromatographiert. Nach Eindampfen der entsprechenden Fraktionen wird beim Einengen ein farbloses, blasiges Produkt erhalten, das nach Trocknen mit Ether verrieben wird.

Ausbeute: 4.2 g (89 % d.Th.)
Fp.: 50°C (Sintern), 151°C (Zers.)
Rf_A: 0.84

$C_{48}H_{53}N_3O_8S$ (831.98) Ber: C 69.30 H 6.42 N 5.05 S 3.84
Gef: C 69.42 H 6.25 N 5.21 S 4.15

4.4.4. O-Benzyl-L-threonyl-O-benzyl-L-seryl-S-trityl-L-cystein-Bortrifluoretherat (H-L-Thr(Bzl)-L-Ser(Bzl)-L-Ser(Bzl)-L-Cys(Trt)-OH.BF_3)

1.0 g (1.2 mMol) Boc-L-Thr(Bzl)-L-Ser(Bzl)-L-Cys(Trt)-OH werden in 5 ml Eisessig gelöst, mit 0.15 ml Bortrifluoretherat versetzt und 1.5 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach Entfernen des Eisessigs im Vakuum wird 2 mal mit Essigester nachextrahiert und der ölige Rückstand im Hochvakuum über Kaliumhydroxid getrocknet. Das Dünnschichtchromatogramm ergibt keinerlei Hinweise auf eine Enttritylierung am Cystein, jedoch verbleiben etwa 5 % Ausgangsprodukt. Durch Kristallisation aus Essigester-Ether bei 0°C erhält man ein amorphes Produkt. Die Gelchromatographie auf LH 20 mit Methanol ergibt 2 Fraktionen, welche jedoch dem BF_3-Salz, bzw. dem freien Amin zuzuordnen sind (s.S. 31).

Ausbeute: 790 mg (82.5 % d.Th.)
Rf_A: 0.62, Rf_D: 0.55
$[\alpha]_D^{20}$: + 15.53° (c=1.2, DMF)

$C_{43}H_{45}N_3O_6S \cdot BF_3$ (799.75) Ber: C 64.58 H 5.67 N 5.25 F 7.12
Gef: C 67.79 H 5.97 N 5.50 F 4.12
(Erklärung S. 31)

5. Synthese von Somatostatin; Syntheseweg 2

5.1. Darstellung der Sequenz 8-14

5.1.1. N^{α}-[1-(1-Adamantyl)-1-methylethoxycarbonyl]-L-tryptophyl-N-hydroxysuccinimidester (Adpoc-L-Trp-OSu)

3.6g(8.5 mMol) Adpoc-L-Trp-OH werden mit 1.04 g (9 mMol) N-Hydroxysuccinimid in 25 ml Ethylenglykoldimethylether gelöst und auf -30°C gekühlt. Dann werden 1.86 g (9 mMol) DCC,

gelöst in wenig Ethylenglykoldimethylether, zugegeben. Anschließend wird 1 Stunde bei -30°C, 4 Stunden bei 0°C und schließlich über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Nach Filtration vom ausgefallenen Dicyclohexylharnstoff bei 0° wird am Rotationsverdampfer zur Trockene eingeengt. Das braune Öl wird in 50 ml Ether aufgenommen und mit Petrolether gefällt.

Ausbeute: 3.72 g (84 % d.Th.)
Fp.: 67-69°C

$[\alpha]_D^{20}$: -19.6° (c=0.98,DMF)

$C_{29}H_{35}N_3O_6$ (521.61) Ber: C 66.78 H 6.76 N 8.05
Gef: C 66.45 H 6.67 N 8.00

5.1.2. N^{α}-[1-(1-Adamantyl)-1-methylethoxycarbonyl]-L-tryptophyl-N^{ε}-carbobenzoxy-L-lysin (Adpoc-L-Trp-L-Lys(Z)-OH)

2.15 g (7.7 mMol) H-L-Lys(Z)-OH und 0.82 g (7.7 mMol) Natriumcarbonat werden in 15 ml Wasser und 5 ml Dioxan gelöst und tropfenweise mit 3.0 g (7 mMol) Adpoc-L-Trp-OSu in 10 ml Dimethylformamid versetzt. Nach 4 Stunden Rühren bei Raumtemperatur wird weitgehend eingeengt, der Rückstand in Essigester aufgenommen und mit 2 N Zitronensäure auf einen pH von 3 angesäuert. Die organische Phase wird abgetrennt, neutral gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Beim Einengen bei 40°C/10 Torr verbleibt ein blasiger Schaum, der zur weiteren Reinigung an LH 20 in Methanol gereinigt wird. Nach Einengen der betreffenden Fraktionen wird das kristallin anfallende Produkt über P_2O_5 getrocknet.

Ausbeute: 3.31 g (69.0 % d.Th.)
Rf_D: 0.47

$[\alpha]_D^{22}$: -8.7° (c=0.5, MeOH)
$C_{39}H_{50}N_4O_7$ (686.86) Ber: C 68.20 H 7.33 N 8.15
Gef: C 69.32 H 7.45 N 7.97

5.1.3. N-[1-(1-Adamantyl)-1-methylethoxycarbonyl]-O-benzyl-L-threonyl-L-phenylalaninmethylester (Adpoc-L-Thr(Bzl)-L-Phe-OMe)

3.1 g (7.2 mMol) Adpoc-L-Thr(Bzl)-OH und 1.72 g (8 mMol) H-L-Phe-OMe.HCl werden in 25 ml DMF/Methylenchlorid (1:1) gelöst, mit 0.92 g (8mMol) N-Ethylmorpholin und 1.08 g HOBt versetzt und auf -5°C gekühlt. Nach 10 Minuten werden 1.65 g (8mMol) Dicyclohexylcarbodiimid, gelöst in DMF, zugegeben und die Reaktionsmischung 1 Stunde in der Kälte, dann 12 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach Kühlen und Filtration wird im Vakuum eingeengt, der Rückstand in Ether aufgenommen und mit 2 N Zitronensäure, 5 % Natriumhydrogencarbonatlösung und schließlich mit Wasser neutral gewaschen. Nach Trocknen über Natriumsulfat wird vom Lösungsmittel befreit und das entstandene Öl bei 10^{-2} Torr getrocknet. Kristallisationsversuche schlugen fehl.

Ausbeute: 3.8 g (farbloses Öl, 64.32 % d.Th.)
Rf_D: 0.82

$[\alpha]_D^{20}$: + 7.6° (c=0.7, MeOH)
$C_{35}H_{46}N_2O_6$ (590.76)

5.1.4. N-[1-(1-Adamantyl)-1-methylethoxycarbonyl]-O-benzyl-L-threonyl-L-phenylalanin (Adpoc-L-Thr(Bzl)-L-Phe-OH)

3.4 g (5.7 mMol) des Methylesters werden in 30 ml Methanol unter Zugabe von 3 x 1 ml 2 N Natriumhydroxidlösung während 1 Stunde verseift. Nach Titration auf pH 7 mit 2 N Zitronensäure wird weitgehend eingeengt, mit 100 ml Wasser aufgenommen und 2 mal mit 10 ml Ether extrahiert, anschließend wird in der Kälte auf pH 3 angesäuert, mit Essigester extrahiert und die organische Phase mit NaCl-gesättigtem Wasser neutral gewaschen. Es verbleibt ein hochsauberes Dipeptid, das beim Eindampfen im Vakuum einen blasigen Schaum bildet. Nach Trocknen im Hochvakuum über P_2O_5

wird ein amorphes, farbloses Produkt erhalten.

Ausbeute: 2.6 g (79.1 % d.Th.)
Fp.: 75-76°C (Zerfl.)
Rf_D: 0.53

$[\alpha]_D^{22}$: +18.67° (c=0.7,DMF)

$C_{34}H_{44}N_2O_6$ (576.74) Ber: C 70.80 H 7.69 N 4.86
Gef: C 70.58 H 7.57 N 4.63

5.1.5. N-[1-(1-Adamantyl)-1-methylethoxycarbonyl]-O-benzyl-L-threonyl-L-phenylalanyl-O-benzyl-L-threonyl-o-benzyl-L-serinmethylester (Adpoc-L-Thr(Bzl)-L-Phe-L-Thr(Bzl)-L-Ser(Bzl)-OCH_3)

2.1 g (4.2 mMol) Boc-L-Thr(Bzl)-L-Ser(Bzl)-OMe werden bei 0°C mit 20 ml TFA/CH_2Cl_2 (1:1) versetzt und 60 Minuten gerührt. Nach Einengen im Vakuum wird 3 mal mit je 20 ml Methanol nachextrahiert und jeweils eingedampft. Der Rückstand wird in Essigester aufgenommen und das Produkt durch Zugabe von Petrolether gefällt. Man wiederholt das Umfällen und trocknet dann das farblose, dünnschichtchromatographisch völlig einheitliche Produkt über NaOH im Vakuum (Ausbeute 2.1 g, 97 % d.Th., Rf. 0.67). Nach Trocknen wird die Aminokomponente in 30 ml Methylenchlorid gelöst, mit N-Ethylmorpholin auf einen "pH" von 8 (feuchtes Indikatorpapier) gebracht und nach Zugabe von 2.1 g (3.65 mMol) Adpoc-L-Thr(Bzl)-L-Phe-OH und 540 mg (4 m Mol) HOBt auf -5°C gekühlt. Nach 10 Minuten werden 825 mg (4 mMol) DCC, gelöst und vorgekühlt, in 10 ml Methylenchlorid zugegeben und 1 Stunde in der Kälte, dann 12 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach Filtration und Einengen der Lösung wird der Rückstand in 80 ml Ether aufgenommen und wie üblich sauer, alkalisch und schließlich mit NaCl-gesättigtem Wasser neutral gewaschen. Aus Benzol/Petrolether erhält man nach Trocknen über Natriumsulfat farblose Kristalle.

Ausbeute: 3.1 g (88.5 % d.Th.)

Fp.: 136°C

Rf_D: 0.85

$[\alpha]_D^{22}$: +19.65° (c=0.8, DMF)

$C_{56}H_{70}N_4O_{10}$ (959.20) Ber: C 70.12 H 7.35 N 5.84
Gef: C 70.39 H 7.57 N 5.80

5.1.6. O-Benzyl-L-threonyl-L-phenylalanyl-O-benzyl-L-threonyl-O-benzyl-L-serinmethylester (H-L-Thr(Bzl)-L-Phe-L-Thr(Bzl)-L-Ser(Bzl)-OMe.TFA)

1.2 g (1.25 mMol) Adpoc-L-Thr(Bzl)-L-Phe-L-Thr(Bzl)-L-Ser(Bzl)-OMe werden bei Raumtemperatur mit 20 ml 3 % TFA/CH_2Cl_2 (v/v) übergossen und 20 Minuten lang gerührt. Man engt im Vakuum bei 35°C Badtemperatur ein, nimmt in 20 ml Methanol auf und dampft wiederum ein. Nach Aufnehmen in Essigester/Äther wird das Produkt bei 0°C durch Zugabe von Petrolether gefällt. Das farblose, amorphe Produkt wird bei 10^{-2} Torr über KOH getrocknet.

Ausbeute: 900 mg (84.3 % d.Th.)

Fp.: 79°C

Rf_D: 0.64

$[\alpha]_D^{20}$: +21.2° (c=0.8,DMF)

$C_{42}H_{50}N_4O_8$ (852.92) Ber: C 61.96 H 6.02 N 6.56
Gef: C 61.22 H 5.73 N 6.24

5.1.7. N^{α}-[1-(1-Adamantyl)-1-methylethoxycarbonyl]-L-tryptophyl-N^{ε}-carbobenzoxy-L-lysyl-O-benzyl-L-threonyl-L-phenylalanyl-O-benzyl-L-threonyl-O-benzyl-L-serin-methylester (Adpoc-L-Trp-L-Lys(Z)-L-Thr(Bzl)-L-Phe-L-Thr(Bzl)-L-Ser(Bzl)-OMe)

686.9 mg (9 mMol) Adpoc-L-Trp-L-Lys(Z)-OH und 840 mg H-L-Thr(Bzl)-L-Phe-L-Thr(Bzl)-L-Ser(Bzl)-OMe.TFA werden in 20 ml Methylenchlorid gelöst, mit 104 mg (9 mMol) N-Ethylmorpholin

und 122 mg (9 mMol) HOBt versetzt und auf -5°C gekühlt. Nach 10 Minuten werden 206 mg (10 mMol) DCC, gelöst und vorgekühlt, in wenig Methylenchlorid zugegeben und die Lösung 1 Stunde in der Kälte, dann 12 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach Filtration bei 0°C wird eingeengt und der Rückstand in Essigester aufgenommen und wie üblich sauer, alkalisch und schließlich mit NaCl-gesättigtem Wasser neutral gewaschen. Nach Trocknen über Natriumsulfat wird eingeengt und aus Essigester/Petrolether gefällt.

Ausbeute: 850 mg (67 % d.Th.)
Fp.: 166-168°C
Rf_D: 0.83
$[\alpha]_D^{20}$: + 11.70 (c=0.6, DMF)

$C_{81}H_{98}N_8O_{14}$ (1407.73) Ber: C 69.11 H 7.01 N 7.96
Gef: C 68.37 H 7.27 N 7.89

5.1.8. N^{α}[- 1-(1-Adamantyl)-1-methylethoxycarbonyl]-L-tryptophyl-N^{ε}-carbobenzoxy-L-lysyl-O-benzyl-L-threonyl-L-phenylalanyl-O-benzyl-L-threonyl-O-benzyl-L-serinhydrazid (Adpoc-L-Trp-L-Lys(Z)-L-Thr(Bzl)-L-Phe-L-Thr(Bzl)-L-Ser(Bzl)-$NHNH_2$)

1.8 g (1.28 mMol) des Methylesters werden in 10 ml DMF / MeOH (9:1) aufgenommen, mit 1 ml Hydrazinhydrat versetzt und bei Raumtemperatur 2 Tage lang gerührt (nach 1 Tag Ausfällung). Nach Einengen auf die Hälfte des Volumens wird auf 50 ml Eiswasser gegossen, das ausgefallene Produkt abfiltriert und nach Waschen mit Eiswasser und 3 x 10 ml Ether gut getrocknet. Man erhält ein sehr sauberes, farbloses Produkt.

Ausbeute: 1.69 g (93.9 % d.Th.)
Fp.: 174°C
Rf_D: 0.79
$[\alpha]_D^{22}$: +7.09° (c= 0.8, DMF)
$C_{80}H_{98}N_{10}O_{13}$ (1407.73) Ber: C 68.25 H 7.02 N 9.95
Gef: C 67.70 H 6.98 N 9.84

5.1.9. N^{α}-[1-(1-Adamantyl)-1-methylethoxycarbonyl]-L-tryptophyl-N^{ε}-carbobenzoxy-L-lysyl-O-benzyl-L-threonyl-L-phenylalanyl-O-benzyl-L-threonyl-O-benzyl-L-seryl-L-trityl-L-cystein (Adpoc-L-Trp-L-Lys(Z)-L-Thr(Bzl)-L-Phe-L-Thr(Bzl)-L-Ser(Bzl)-L-Cys(Trt)-OH)

1.35 g (0.96 mMol) Adpoc-L-Trp-L-Lys(Z)-L-Thr(Bzl)-L-Phe-L-Thr(Bzl)-L-Ser(Bzl)-$NHNH_2$ in 10 ml DMF wird bei -30°C mit 1.2 ml 2.5 N HCl in Tetrahydrofuran (3 mMol) und 0.14 ml (1.1 mMol) tert.-Butylnitrit versetzt. Nach dem der Hydrazidtest negativ ausfällt (15 Minuten) wird noch für weitere 10 Minuten gerührt, dann neutralisiert man durch Zugabe von 0.38 ml (3 mMol) N-Ethylmorpholin. Nun tropft man unter Rühren bei -30°C eine Lösung von 0.73 g (2 mMol) S-Tritylcystein und 0.28 ml (2 mMol) Triethylamin in 10 ml DMF/H_2O (9:1) zu. Nach 2 Stunden bei -20°C, 12 Stunden bei 0°C und 12 Stunden bei Raumtemperatur wird bei 35°/0.01 Torr eingedampft. Der Rückstand wird in 40 ml Essigester aufgenommen, bei 0°C mit 2 N Zitronensäure angesäuert, dann mit NaCl-gesättigtem Wasser gewaschen. Nach Trocknen über Natriumsulfat wird eingeengt, mit Ethanol aufgenommen und mit Ether gefällt (1.5 g = 91 %). Das Produkt enthält noch Spuren an H-Cys(Trt)-OH. Durch Kristallisation aus absolutem Ethanol wird ein hochreines Produkt erhalten.

Ausbeute: 1250 mg (74.91 % d.Th.)
Fp.: 146-149°C
Rf: 0.78 (Benzol-Methanol-Chloroform 1:1:1)
$[\alpha]_D^{22}$: +8.6°(c=0.5, DMF)
$C_{102}H_{115}N_9O_{15}S$ (1739.12) Ber: C70.44 H 6.66 N 7.24 S 1.84
Gef: C69.74 H 6.58 N 7.36 S 2.42

5.1.10. L-Tryptophyl-N^{ε}-carbobenzoxy-L-lysyl-O-benzyl-L-threonyl-L-phenylalanyl-O-benzyl-L-threonyl-O-benzyl-L-seryl-S-trityl-L-cystein (H-L-Trp-L-Lys(Z)-L-Thr(Bzl)-L-Phe-L-Thr(Bzl)-L-Ser(Bzl)-L-Cys(Trt)-OH)

270 mg (0.15 mMol) des Adpoc-geschützten Heptapeptids werden bei 0°C mit 1 ml 3 % Trifluoressigsäure in Methylen-

chlorid unter Zusatz von 10 % Anisol versetzt. Nach 30 Minuten Rühren (die Lösung bleibt dabei völlig klar), werden 5 ml abs.Benzol zugesetzt und am Rotationsverdampfer bei 30°C vorsichtig abgezogen. Der Rückstand wird mit kaltem n-Hexan digeriert und der Überstand abdekantiert. Man kristallisiert aus Essigester/n-Hexan um. Es entsteht ein farbloses Produkt, welches positive Reaktion auf Ninhydrin und Ehrlich-Reagens zeigt.

Ausbeute: 230 mg (90.71 % d.Th.). Ein 0.5 mmolarer Ansatz führt zu 88.5 % Ausbeute.
Fp.: 114° (Sintern), 138° (Zers.)
Rf: 0.79 (Benzol/Chloroform/Methanol 1:1:1), Rf_D: 0.53

$C_{88}H_{95}N_9O_{13}S.CF_3COOH$ (1632.80) Ber: C 63.73 H 5.93 N 7.72
Gef: C 63.59 H 5.81 N 7.85

5.2. Darstellung der Sequenz 1-14

5.2.1. N-tert.-Butyloxycarbonyl-L-alanyl-glycyl-S-trityl-L-cysteinyl-N^{ε}-tert.-butyloxycarbonyl-L-lysyl-L-asparaginyl-L-phenylalanyl-L-phenylalanyl-L-tryptophyl-N^{ε}-carbobenzoxy-L-lysyl-O-benzyl-L-threonyl-L-phenylalanyl-O-benzyl-L-threonyl-O-benzyl-L-seryl-S-trityl-L-cystein (Boc-L-Ala-Gly-L-Cys-L-Lys(Boc)-L-Asn-L-Phe-L-Phe-L-Trp-L-Lys(Z)-L-Thr(Bzl)-L-Phe-L-Thr(Bzl)-L-Ser(Bzl)-L-Cys(Trt)-OH)(geschütztes Somatostatin)

Zu 547 mg (0.44 mMol) Boc-L-Ala-Gly-L-Cys(Trt)-L-Lys(Boc)-L-Asn-L-Phe-L-Phe-$NHNH_2$ in 5 ml DMF werden bei -30°C 0.44 ml (1.1 mMol) 2.5 N HCl in Tetrahydrofuran und 0.057 ml (0.5 mMol) tert.-Butylnitrit gegeben. Nachdem der Hydraziddtest negativ ausfällt (15 Minuten) wird noch 10 Minuten gerührt, dann durch Zugabe von 0.15 ml (1.1 mMol) Triethylamin neutralisiert. Nun wird eine Lösung von 770 mg (0.47 mMol) H-L-Trp-L-Lys(Z)-L-Thr(Bzl)-L-Phe-L-Thr(Bzl)-L-Ser(Bzl)-L-Cys(Trt)-OH und 0.066 ml (0.47 mMol) Triethylamin in 5 ml DMF bei -25°C zugetropft. Nach 2 Stunden bei -20°C, 12 Stunden bei 0°C und 12 Stunden bei Raumtemperatur wird auf eine

eiskalte, 10%-Zitronensäurelösung gegossen, wobei ein farbloses Produkt ausfällt. Der Niederschlag wird abfiltriert, mit 10 % Zitronensäure (2 ml), Wasser (10 ml) und 50 ml Ether gewaschen. Nach Trocknen wird in Methanol suspendiert und bei 0°C abfiltriert.

Ausbeute: 1010 mg (82.4 % d.Th.)
Fp.: 228-230°C
Positive Reaktion auf Ehrlichs-Reagens und auf Xanthydrol-Reagens [120];
Negative Reaktion auf Ninhydrin. Das Produkt ist in Methanol schlecht, in DMF gut löslich.
Rf_C: 0.6
$C_{153}H_{174}N_{18}O_{25}S_2$ (2729.29) Ber: C 67.33 H 6.43 N 9.23 S 2.35
Gef: C 66.71 H 6.31 N 9.69 S 1.95
Ergebnis der Aminosäureanalyse: (6 N HCl, 16 Std., 110°C, Zusatz von 2.5 % Thioglycolsäure)

	Ala	Gly	Cys	Lys	Asp	Phe	Thr	Ser	Trp
Ber:	1	1	2	2	1	3	2	1	1
Gef:	1.00	1.01	1.37	2.12	1.02	3.02	2.10	0.82	0.49

5.3. Darstellung H-L-Ala-Gly-L-Cys-L-Lys-L-Asn-L-Phe-L-Phe-L-Trp-L-Lys-L-Thr-L-Phe-L-Thr-L-Ser-L-Cys-OH (Somatostatin)

5.3.1. Abspaltung mit HF-Anisol-Ethandithiol

a) Zu 200 mg (0.072 mMol) des geschützten Tetradecapeptids, 1 ml Anisol und 0.1 ml Ethandithiol kondensiert man bei ca. -5°C 10 ml Fluorwasserstoff (Fa.Merck, "Laborgas", vorgetrocknet über Kobalttrifluorid) und rührt 50 Minuten bei dieser Temperatur. Darauf bläst man den Fluorwasserstoff mit Stickstoff (reinst) in ca. 15 Minuten bei 0°C weitgehend ab; restliches HF wird durch Anlegen eines Vakuums (es wird ein Trockenrohr 40 x 1 cm, gefüllt mit KOH-Pillen dazwischengeschaltet) entfernt.

Die Entfernung des HF soll bei 0°C stattfinden und 30 Minuten nicht übersteigen. Der Rückstand wird nun während 3 Stunden im Hochvakuum über KOH getrocknet und 3 mal mit je 5 ml peroxidfreiem Ether gewaschen. Nach Trocknen erhält man ein leicht bräunliches Pulver, welches im DC deutliche Reaktion mit Ellman-Reagens zeigt.

Ausbeute: 106 mg (95 % d.Th.)
Rf (Butanol/Eisessig/Wasser 4:1:5, Oberphase): 0.30

b) 53 mg des so erhaltenen linearen Somatostatins werden nun in 55o ml einer 0.005 Ammoniumacetatlösung gelöst, der pH wird auf pH 6.7 - 6.9 eingestellt und die Lösung nach kurzem Rühren für 72 Stunden im Dunkeln gelassen. Nach jeweils 12 Stunden wird die Reaktion durch HPLC-Messungen untersucht (s.S.76). Während des Oxidationsvorgangs wird die Lösung leicht trübe (Polymerenbildung). Nach 72 Stunden wird die Lösung über Celite filtriert, bei 10° Badtemperatur im Vakuum eingeengt und zur Entfernung des NH_4Ac 2 mal gefriergetrocknet. Es verbleibt ein farbloses, flockiges Pulver.

Ausbeute: 40 mg (76 % d.Th.)
Rf (Butanol/Eisessig/Wasser, 4:1:5, Oberphase): 0.36

38 mg des so oxidierten Produkts werden in 0.4 ml 2 N Essigsäure aufgenommen und an Sephadex G 25 mit 2 N Essigsäure gelchromatographiert. (Chromatogramm s.S.76). Fraktionen 20-24 ergeben nach Gefriertrocknung 15.9 ml eines ca. 80-90 % reinen Somatostatins.

c) 3 mg werden nun durch Ionenaustauschchromatographie an gereinigter (waschen mit 0.5 N NaOH, mit 0.5 N HCl, mit H_2O bis pH 7, jeweils großzügiges Abdekantieren der "fines") Carboxymethyl-Cellulose chromatographiert. Die Säule wird in 0.025 m NH_4Ac-Puffer (pH 7) äquilibriert, die Elution erfolgt mit 0.05 m NH_4Ac-Puffer (pH 7) unter isokratischen Bedingungen (Elutionsprofil s.S.78).

Fraktionen 6-8 ergeben 0.39 mg eines flockig-weißen Pulvers, das in allen Fließmittelsystemen identisch mit einer Referenzprobe läuft.

d) 3 mg der somatostatinhaltigen G 25-Fraktionen werden an LH 20 mit 2 N Essigsäure gelchromatographiert. Elutionsdiagramm s.S. 79. Fraktionen 11-14 ergeben nach doppelter Gefriertrocknung in 1 N Essigsäure ein flokkiges, farbloses Pulver, das mit einer Referenzprobe identisches Laufverhalten in allen Fließmittelsystemen zeigt.

Summenformel für reines Somatostatin: $C_{75}H_{104}N_{18}O_{18}S_2$

Molekulargewicht: 1608.95.
Ergebnisse der Aminosäurenanalyse und der Elektrophorese sind auf S. 79 beschrieben.

Dünnschichtchromatographie

Fließmittelsysteme		R_f
n-Butanol/Essigsäure/Essigester/Wasser	1:1:1:1	0.45
Essigester/Pyridin/Eisessig/Wasser	5:5:2:3	0.51
n-Butanol/Pyridin/0.1 % Essigsäure (Oberphase)	5:3:11	0.42
Isopropanol/1 N Essigsäure	1:1	0.71
n-Butanol/Eisessig/Wasser (Oberphase)	4:1:5	0.35
n-Butanol/Isopropanol/1 N NH_3-Essigester	1:1:2.5:1	0.31
n-Propanol/Pyridin Wasser/Essigsäure/Essigester	5:4:6:1:4	0.81

5.3.2. Abspaltung mit Bortristrifluoracetat (BTFA) [145]

27 mg (10 µmol) des geschützten Somatostatins und 1 mMol Thioanisol werden in 0.5 ml Trifluoressigsäure gelöst, auf -10°C abgekühlt und mit 0.5 mMol einer ca. 2-molaren BTFA-Lösung in TFA versetzt. Man rührt 1 1/2 - 2 Stunden bei -10° bis 0°C (rötliche Lösung). Darauf versetzt man mit kaltem (-60°C) absolutem Methanol (ca. 10 ml), wobei eine klare gelbliche Lösung entsteht. Diese Lösung wird nun mit 50 ml absolutem Ether verrührt. Nach Zugabe von HCl in Ether fällt das cysteinhaltige Peptid komplett aus (Borsäure-Derivate bleiben in Lösung). Man filtriert oder zentrifugiert. Der gelartige Rückstand wird sofort in 50%iger Essigsäure gelöst, auf 130 ml mit Wasser verdünnt und mit 1 N NH_3 auf pH 6.8 eingestellt. Nach 72 Stunden Stehen im Dunkeln wird die Lösung über Celite abfiltriert, im Vakuum bei 10°C Badtemperatur eingeengt und anschließend 2-mal gefriergetrocknet. Der leicht gelbliche Rückstand wird an Sephadex G 25 gelchromatographiert (Säule 85 x 1.4 cm, Elutionsmittel 2 N Essigsäure, Fraktionen à 5 ml). Die Fraktionen 24-29 werden eingeengt, gefriergetrocknet und durch weitere Gelfiltration an G 25 weitergereinigt. (HPLC-Chromatogramm s.S. 75). Fraktionen 23-26 enthalten 2.7 mg (17 % d.Th.) einer Substanz, welche identisches Laufverhalten in allen angegebenen Fließmittelsystemen (Kap. 5.3.1.) mit einer Referenzprobe zeigt.

6. Synthese von Somatostatin, Syntheseweg 3

6.1. Darstellung der Sequenz 8-14

6.1.1. L-Serin-methylester·Hydrochlorid (H-L-Ser-OCH_3.HCl)

Zu 500 ml absolutem Methanol gibt man bei -10°C unter Rühren 130 ml destilliertes Thionylchlorid, anschließend portionsweise 52.5 g (0.5 Mol) L-Serin. Nach ca.2 Stunden Rühren bei Raumtemperatur erhält man eine vollständige Lösung, welche für weitere 18 Stunden bei Raumtemperatur gerührt wird. Nach Einengen im Vakuum löst man den Rückstand in 200 ml Methanol und fällt das Produkt durch Zugabe von 700 ml abs. Ether. Die farblosen Kristalle werden über KOH im Vakuum getrocknet.

Ausbeute: 71.9 g (92.3 % d.Th.)
Fp.: 167-168°C, Lit. 168° [139]
Rf_D: 0.25
$[\alpha]_D^{20}$: -2.7° (c=1,DMF), Lit.$[\alpha]_D^{23}$: -2.5° ± 0.5 (c=1.8,DMF)

$C_4H_{10}NO_3Cl$ (155.58) Ber: C 30.88 H 6.47 N 9.45 Cl 22.79
Gef: C 30.59 H 6.67 N 9.37 Cl 21.99

6.1.2. N-Benzyloxycarbonyl-L-serinmethylester (Z-L-Ser-OMe)

46.67 g (0.3 Mol) L-Serinmethylester-Hydrochlorid werden in 300 ml Chloroform gelöst und bei 0°C mit 84 ml (0.6 Mol) Triethylamin versetzt. Innerhalb einer Stunde werden nun 46.6 ml (0.33 Mol) Chlorameisensäurebenzylester zugetropft. Nach Rühren über Nacht bei Raumtemperatur wird zunächst mit 100 ml Wasser, danach 3 x mit 2 N Zitronensäure, 1 x alkalisch und schließlich neutral gewaschen. Nach Trocknen über Natriumsulfat wird eingeengt und der ölige Rückstand mit 100 ml eiskaltem Hexan versetzt. Nach Abdekantieren der Hexanphase wird nochmals im Vakuum eingeengt. Es verbleibt ein sirupartiger Rückstand.

Ausbeute: 73.7 g (97 % d.Th.)
Rf_D: 0.56

$[\alpha]_D^{20}$: -12.1° (c=1.4,MeOH), Lit. $[\alpha]_D^{22}$: -12.5°,MeOH)[136]
$C_{12}H_{15}N\,O_5$ (253.26) Ber: C 56.91 H 5.97 N 5.53
Gef: C 56.52 H 5.71 N 5.27

6.1.3. N-Benzyloxycarbonyl-O-tert.-butyl-L-serinmethylester (Z-L-Ser(Bu^t)-OMe)

30.8 g (120 mMol) Z-L-Ser-OMe in 120 ml abs.Methylenchlorid und 1.5 ml konz. Schwefelsäure werden bei 0°C mit 120 ml Isobutylen versetzt und im Autoklaven oder einer dickwandigen Flasche 3 Tage lang gerührt. (Es entsteht lediglich ein Überdruck von 1-2 atü). Danach neutralisiert man mit Triethylamin und dampft vorsichtig ein. Der ölige Rückstand wird in 300 ml Essigester/Ether (1:1) aufgenommen, mit ges. $NaHCO_3$-Lösung, dann mit Wasser neutral gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und eingedampft. Nach Stehenlassen bei 0°C erstarrt der Rückstand zu einer festen Masse.

Ausbeute: 35.7 g (96 % d.Th.)
Fp.: 30-33°C, Lit. 32-33° [136]
Rf_D: 0.90
$[\alpha]_D^{22}$: +5.2°(c=2,EtOH); Lit.$[\alpha]_D^{23}$: +4.6° (c=1,EtOH)
$C_{16}H_{23}NO_5$ (309.4) Ber: C 62.12 H 7.49 N 4.53
Gef: C 61.70 H 7.07 N 4.35

6.1.4. O-tert.-Butyl-L-serinmethylester·Hydrochlorid (H-L-Ser(Bu^t)-OCH_3·HCl)

15.46 g (50 mMol) Z-L-Ser(Bu^t)-OCH_3 werden in 150 ml Methanol mit Pd/C hydriert, wobei der pH durch Zugabe von halbgesättigter etherischer HCl bei pH 4.5 gehalten wird. Nach 60 Minuten wird abfiltriert und im Vakuum eingedampft. Nach zweimaliger Kristallisation aus Essigester/

Ether erhält man farblose Kristalle.

Ausbeute: 9.3 g (88 % d.Th.)
Fp.: 174°C, Lit. 171-172 [136]
Rf_A: 0.48, Rf_D: 0.62
$[\alpha]_D^{22}$: +7.9° (c=1,DMF); $[\alpha]_D^{25}$: +7.7° (c=1, DMF)
$C_8H_{17}NO_3.HCl$ (211.7) Ber: C 45.39 H 8.57 N 6.62
Gef: C 45.24 H 8.65 N 6.71

6.1.5. L-Threoninmethylester (H-L-Thr-OCH_3)

59.5 g (0.5 Mol) L-Threonin in 500 ml Methanol werden mittels Thionylchlorid (58.9 g) analog zum Serinderivat zum Methylester umgesetzt. Nach Freisetzen des Amins mit $CHCl_3$/3 % NH_3 bei 0° (15 Minuten) wird nach Filtration eingeengt und aus Essigester/Petrolether kristallisiert.

Ausbeute: 60.91 g (91.5 % d.Th.)
Fp.: 71-72°, Lit. 70-72° [148]
Rf_D: 0.34
$[\alpha]_D^{23}$: + 5.2° (c=1,MeOH), Lit.$[\alpha]_D^{25}$: +5.0 (c=3,MeOH)
$C_5H_{11}NO_3$ (133.15) Ber: C 45.1o H 8.32 N 10.52
Gef: C 44.87 H 8.50 N 10.47

6.1.6. N-Benzyloxycarbonyl-L-threoninmethylester (Z-L-Thr-OCH_3)

40.5 g (0.24 Mol) des Methylesters werden bei -5°C in 350 ml Chloroform gelöst, mit 24.26 g (0.24 Mol) Triethylamin versetzt und unter gleichzeitigem Zutropfen von 46.88 g CbO-Cl (0.275 Mol) und 22.8 g (0.275 Mol) Triethylamin carbobenzoxyliert. Aufarbeitung wie beim Serinderivat. Aus Chloroform/Ether/Petrolether erhält man lange, farblose Nadeln.

Ausbeute: 63.9 g (95 % d.Th.)

Fp.: 93°C, Lit. 90°C [137]
Rf_D: 0.60
$[\alpha]_D^{22}$: -17.5° (c=1,MeOH), Lit.$[\alpha]_D^{20}$: -17.3°(c=1,MeOH)
$C_{13}H_{17}NO_5$ (269.25) Ber: C 57.99 H 6.36 N 5.2o
Gef: C 58.09 H 6.42 N 5.03

6.1.7. N-Benzyloxycarbonyl-O-tert.-butyl-L-threonin-methylester (Z-L-Thr(Bu^t)-OCH_3)

Man arbeitet, wie beim Serinderivat beschrieben, mit 26.7 g (0.1 Mol) des vorstehenden Esters, 120 cm^3 Isobutylen, 100 cm^3 Methylenchlorid und 1 cm^3 konz. Schwefelsäure.

Ausbeute : 30.9 g (95.6 % d.Th.), farbloses Öl
Rf_D: 0.80
$[\alpha]_D^{20}$: +6.2° (c=1,DMF), Lit.$[\alpha]_D^{20}$: +6.3° (c=1,DMF) [136]
$C_{17}H_{25}NO_5$ (323.39) Ber: C 63.19 H 7.79 N 4.33
Gef: C 62.89 H 7.83 N 3.97

6.1.8. N-Benzyloxycarbonyl-O-tert.-butyl-L-threonin-Dicyclohexylammoniumsalz (Z-L-Thr(Bu^t)-OH .DCHA)

18.8 g (0.58 Mol) des Z-L-Thr(Bu^t)OMe in 200 cm^3 Dioxan/Wasser (4:1) werden 2 Stunden mit 31.9 cm^3 2 N NaOH bei Raumtemperatur gerührt. Nach Neutralisation mit 1 N HCl auf pH 7 wird im Vakuum weitgehend eingedampft, der Rückstand in 50 ml Wasser aufgenommen, 3 mal mit 40 cm^3 Ether ausgeschüttelt und bei 0°C mit 10 % Zitronensäurelösung angesäuert. Das ausfallende Öl wird in Essigester aufgenommen, neutral gewaschen, getrocknet und im Vakuum eingeengt. Der farblose Rückstand kristallisiert nach Zugabe von 10.8 g Dicyclohexylamin in Petrolether/Ether (5:1). Die Umkristallisation aus Ethanol/Ether/Petrolether ergibt ein farbloses Kristallisat.

Ausbeute: 21.6 g (76 % d.Th.)
Fp.: 145-146°C, Lit. 146-147°C [136]
Rf_D: 0.55
$[\alpha]_D^{22}$: +9.88° (c=1,Ethanol), $[\alpha]_D^{20}$: +9.95° (c=1,EtOH)
$C_{28}H_{46}N_2O_5$ (490.7) Ber: C 68.54 H 9.45 N 5.71
Gef: C 68.38 H 9.55 N 5.87

6.1.9. N-Carbobenzoxy-O-tert.-butyl-L-threonyl-O-tert.-butyl-L-serinmethylester (Z-L-Thr(Bu^t)-L-Ser(Bu^t)-OCH_3)

20.3 g (0.05 Mol) Z-L-Thr(Bu^t)-OSu (hergestellt nach Wünsch [135], jedoch mit Ethylenglycoldimethylether als Lösungsmittel und -30°C Starttemperatur) und 10.57 g (0.05 Mol) H-L-Ser(Bu^t)-OCH_3.HCl werden in 250 cm^3 Essigester gelöst, mit 5.05 g N-methylmorpholin versetzt und bei Raumtemperatur 15 Stunden gerührt. Es wird wie üblich sauer (2 N Zitronensäure), alkalisch ($NaHCO_3$, 5 %) und schließlich neutral gewaschen. Nach Trocknen über Natriumsulfat wird im Vakuum eingeengt. Es verbleibt ein leicht gelbliches, dünnflüssiges Öl.

Ausbeute: 19.82 g (85 % d.Th.)
Rf_D: 0.78
$C_{24}H_{38}N_2O_7$ (466.58)

6.1.10. O-tert.-butyl-L-threonyl-O-tert.-Butyl-L-serinmethylester (H-L-Thr(Bu^t)-L-Ser(Bu^t)-OCH_3)

19 g (40.7 mMol) werden in 300 ml Methanol wie üblich mittels Pd/C (10 Gew. %) im Durchflußverfahren hydriert. Nach 1 Stunde wird vom Katalysator befreit und im Vakuum eingeengt. Das so erhaltene Öl wird sofort weiterverarbeitet.

Ausbeute: 13.12 g (97 % d.Th.)

Rf_D: 0.56
$C_{16}H_{32}N_2O_5$ (332.44)

6.1.11. N-Carbobenzoxy-L-phenylalanyl-O-tert.-butyl-L-threonyl-O-tert.-butyl-L-serinmethylester (Z-L-Phe-L-Thr(Bu^t)-L-Ser(Bu^t)-OCH_3)

9.9 g (25 mMol) Z-L-Phe-OSu [hergestellt nach Anderson [124], jedoch mit Ethylenglycoldimethylether als Lösungsmittel und -30°C als anfängliche Reaktionstemperatur, Ausbeute: 88.6 %, Fp.: 137-139°C, $[\alpha]_D^{22}$: -17.2° (c=2,Dioxan)] und 7.64 g (23 mMol) H-L-Thr(Bu^t)-L-Ser(Bu^t)-OCH_3 werden in 120 ml Essigester/Dioxan (1:1) 15 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach weitgehendem Einengen im Vakuum wird in Essigester aufgenommen und wie üblich sauer, alkalisch, schließlich neutral gewaschen. Nach Trocknen über Natriumsulfat wird eingeengt und aus Essigester/Ether/Petrolether kristallisiert.

Ausbeute: 10.73 g (76 % d.Th.)
Fp.: 102-103°C
Rf_D: 0.72
$[\alpha]_D^{22}$: + 9.5° (c=1,DMF)
$C_{33}H_{47}N_3O_8$ (613.75) Ber: C 64.58 H 7.72 N 6.85
Gef: C 64.56 H 7.65 N 6.88

6.1.12. L-Phenylalanyl-O-tert.-butyl-L-threonyl-O-tert.-butyl-L-serinmethylester·Hydrochlorid (H-L-Phe-L-Thr(Bu^t)-L-Ser(Bu^t)-OCH_3.HCl)

6.1 g (10 mMol) des carbobenzoxygeschützten Tripeptids werden in 50 ml Methanol gelöst und unter Zusatz von 600 mg Pd (10 %)/C im Durchflußverfahren hydriert. Der "pH" wird durch Zugabe von halbgesättigter HCl in Ether auf pH 4 gehalten. Nach 30 Minuten wird vom Katalysator ab-

filtriert und im Vakuum eingeengt. Der ölige Rückstand wird in Ether aufgenommen und mit Petrolether gefällt. Man erhält ein farbloses, dünnschichtchromatographisch einheitliches Produkt, welches über KOH im Hochvakuum getrocknet wird.

Ausbeute: 3.0 g.Aus der Mutterlauge können nach 24 Stunden Stehen bei 0°C nochmals 1.4 g erhalten werden (85.27 % d.Th.)
Fp.: 135-138°C
$C_{25}H_{41}N_3O_6$.HCl (516.07) Ber: C 58.18 H 8.01 N 8.14
Gef: C 57.92 H 8.09 N 8.13

6.1.13. N-Carbobenzoxy-O-tert.-butyl-L-threonyl-L-phenylalanyl-O-tert.-butyl-L-threonyl-O-tert.-butyl-L-serinmethylester (Z-L-Thr(Bu^t)-L-Phe-L-Thr(Bu^t)-L-Ser(Bu^t)-OCH_3)

Zu einer Lösung von 3.0 g (5.8 mMol) H-L-Phe-L-Thr(Bu^t)-L-Ser(Bu^t)-OCH_3.HCl in 50 ml Ethylenglycoldimethylether und 668 mg N-Ethylmorpholin werden bei 5°C 2.48 g Z-L-Thr(Bu^t)-OSu (16.1 mMol) in 30 ml Ethylenglycoldimethylether zugetropft. Nach 15 Stunden Rühren bei Raumtemperatur wird eingeengt, in Essigester aufgenommen und mit Wasser, 2 N Zitronensäure, 5 % $NaHCO_3$-Lösung und schließlich mit Wasser neutral gewaschen. Nach Trocknen über Natriumsulfat wird eingeengt, wobei ein farbloser, amorpher Schaum verbleibt. Zur Hochreinigung wird an LH 20 mit Methanol gelchromatographiert. Bei 2.7 V_o wird ein symetrischer Peak erhalten. Diese Fraktionen werden gesammelt, eingedampft und der Rückstand aus Ether/Petrolether kristallisiert.

Ausbeute: (nach LH 20):2.87 g (64.3 % d.Th.)
Fp.: 111-112°C
Rf_D: 0.79
$[\alpha]_D^{22}$: + 28.1° (c=1,DMF)
$C_{41}H_{62}N_4O_{10}$ (770.97) Ber: C 63.87 H 8.11 N 7.27
Gef: C 63.59 H 8.01 N 7.18

6.1.14. O-tert.-Butyl-L-threonyl-L-phenylalanyl-O-tert.-butyl-L-threonyl-O-tert.-butyl-L-serinmethylester·Hydrochlorid(H-L-Thr(Bu^t)-L-Phe-L-Thr(Bu^t)-L-Ser(Bu^t)-OCH_3.HCl)

2.6 g Z-L-Thr(Bu^t)-L-Phe-L-Thr(Bu^t)-L-Ser(Bu^t)-OMe werden in 100 ml MeOH unter Zusatz von 300 mg Pd (10 %)/C im Durchflußverfahren hydriert, wobei der "pH-Wert" durch eine halbkonzentrierte etherische HCl-Lösung auf pH 4.5 gehalten wird. Nach 1.5 Stunden wird vom Katalysator abfiltriert und im Vakuum eingeengt. Gereinigt wird durch Umfällen aus Ether/Petrolether.

Ausbeute: 1.8 g (79.27 % d.Th.)
Fp.: 142-146°C (bei 166° Zersetzung)
Rf_D: 0.67
$[\alpha]_D^{23}$: -14.2°C (c=1, MeOH)
$C_{33}H_{57}N_4O_8Cl$ (673.29) Ber: C 58.57 H 8.53 N 8.32
Gef: C 59.17 H 8.47 N 8.39

6.1.15. N^{α}-[1-(1-Adamantyl)-1-methylethoxycarbonyl]-L-tryptophyl-N^{ε}-tert.-butyloxycarbonyl-L-lysin (Adpoc-L-Trp-L-Lys(Boc)-OH)

1.0 g (4 mMol) H-L-Lys(Boc)-OH und 424 mg (4 mMol) wasserfreies Natriumcarbonat werden in 10 ml Wasser und 5 ml Dioxan vollständig gelöst und tropfenweise bei 10°C mit 1.5 g (3.5 mMol) Adpoc-L-Trp-OSu in 10 ml DMF versetzt. Nach einer Reaktionszeit von 2 Stunden wird mit 2 N Zitronensäure angesäuert und die wässrige Phase 3 mal mit Ether extrahiert. Nach Neutralwaschen der organischen Phase mit Wasser wird über Natriumsulfat getrocknet, abfiltriert und der nach Einengen im Vakuum erhaltene farblose, blasige Schaum im Hochvakuum getrocknet.

Ausbeute: 1.75 g (76.58 % d.Th.)
Fp.: 98-101°C (Erw.), 134°C (Zers.)
Rf_D: 0.44
$[\alpha]_D^{24}$: -9.83° (c=0.5, MeOH)

$C_{36}H_{52}N_4O_7$ (652.84) Ber: C 66.23 H 8.02 N 8.58
Gef: C 66.69 H 8.20 N 8.49

6.1.16 N^{α}-[1-(1-Adamantyl)-1-methylethoxycarbonyl]-L-tryptophyl-N^{ε}-tert.-butyloxycarbonyl-L-lysyl-O-tert.-butyl-L-threonyl-L-phenylalanyl-O-tert.-butyl-L-threonyl-O-tert.-butyl-L-serinmethylester (Adpoc-L-Trp-L-Lys(Boc)-L-Thr(Bu^t)-L-Phe-L-Thr(Bu^t)-L-Ser(Bu^t)-OCH_3)

674.3 mg (1 mMol) H-L-Thr(Bu^t)-L-Phe-L-Thr(Bu^t)-L-Ser(Bu^t)-OCH_3.HCl und 652 mg (1 mMol) Adpoc-L-Trp-L-Lys(Boc)-OH werden in 20 ml CH_2Cl_2/DMF (1:1) gelöst, mit 135.2 mg (1 mMol) 1-Hydroxybenzotriazol und 101 mg (1 mMol) N-Methylmorpholin versetzt und auf -10°C gekühlt. Nach 10 Minuten fügt man eine vorgekühlte Lösung von 206.33 g (1 mMol) DCC, gelöst in wenig DMF, zu. Nach 1 Stunde Rühren in der Kälte und 12 Stunden bei Raumtemperatur filtriert man den entstandenen N,N'-Dicyclohexylharnstoff bei 0°C ab und entfernt das Lösungsmittel im Vakuum. Anschließend wird in Essigester aufgenommen, die organische Phase mit $NaHCO_3$-, Zitronensäurelösung und zweimal mit Wasser gewaschen. Nach Trocknen wird das Lösungsmittel abgezogen, das zurückbleibende Öl in Essigester aufgenommen und mit Ether/Petrolether gefällt. Es wird ein weißer, kristalliner Niederschlag isoliert. Zur weiteren Reinigung wird die Substanz säulenchromatographisch (LH 20, Elutionsmittel: Methanol) gereinigt.

Ausbeute: (nach Säule): 820 mg (64.5 % d.Th.)
Fp.: 110-112°C
Rf_A: 0.81, Rf_D: 0.87
$[\alpha]_D^{20}$: +1.5°(c=0.48, MeOH), + 7.6° (c=0.76, DMF)
$C_{69}H_{106}N_8O_{14}$ (1271.66) Ber: C 65.17 H 8.40 N 8.81
Gef: C 65.76 H 8.36 N 8.63

6.1.17. N^{α}-[1-(1-Adamantyl)-1-methylethoxycarbonyl]-L-tryptophyl-N^{ε}-tert.-butyloxycarbonyl-L-lysyl-O-tert.-butyl-L-threonyl-L-phenylalanyl-O-tert.-butyl-L-threonyl-O-tert.-butyl-L-serinhydrazid-(Adpoc-L-Trp-L-Lys(Boc)-L-Thr(Bu^t)-L-Phe-L-Thr-(Bu^t)-L-Ser(Bu^t)-NH-NH_2)

1.7 g (1.33 mMol) Adpoc-L-Trp-L-Lys(Boc)-L-Thr(Bu^t)-L-Phe-L-Thr(Bu^t)-L-Ser(Bu^t)-OCH_3 werden in 15 ml MeOH gelöst, mit 1 ml Hydrazinhydrat versetzt und 2 Tage lang bei Raumtemperatur gerührt. Nach Eingießen in 30 ml Eiswasser wird der weiße Niederschlag abfiltriert und mit Petrolether, H_2O und Ether gewaschen. Die Umkristallisation aus MeOH liefert ein reines, farbloses Produkt.

Ausbeute: 1.48 g (87.05 % d.Th.)
Fp.: 201-202°C
Rf_A: 0.79, Rf_D: 0.83
$[\alpha]_D^{25}$: +10.5° (c=0.8,DMF)
$C_{68}H_{106}N_{10}O_{13}$ (1271.67) Ber: C 64.22 H 8.40 N 11.01
Gef: C 63.23 H 8.38 N 10.95

6.1.18. N^{α}-[1-(1-Adamantyl)-1-methylethoxycarbonyl]-L-tryptophyl-N^{ε}-tert.-butyloxycarbonyl-L-lysyl-O-tert.-butyl-L-threonyl-L-phenylalanyl-O-tert.-butyl-L-threonyl-O-tert.-butyl-L-seryl-S-trityl-L-cystein (Adpoc-L-Trp-L-Lys(Boc)-L-Thr(Bu^t)-L-Phe-L-Thr(Bu^t)-L-Ser(Bu^t)-L-Cys(Trt)-OH)

Zu 1.27 g (1 mMol) Adpoc-L-Trp-L-Lys(Boc)-L-Thr(Bu^t)-L-Phe-L-Thr(Bu^t)-L-Ser(Bu^t)-$NHNH_2$ in 10 ml DMF werden bei -32°C 1 ml 2.5 N HCl (2.5 mMol) in THF und 0.131 ml (1.1 mMol) frisch destilliertes tert.-Butylnitrit gegeben. Nachdem der Hydrazidtest negativ ausfällt, wird noch 10 Minuten weitergerührt und dann durch Zugabe von 0.35 ml (2.5 mMol) Triethylamin neutralisiert. Nun tropft man eine Lösung von 727 mg (2 mMol) H-L-Cys(Trt)-OH und 0.42 ml (2 mMol)

Triethylamin in 10 ml DMF/Wasser (8:2) zu, wobei man die Temperatur bei -30°C hält. Man beläßt 2 Stunden bei -18°C, 2 Stunden bei -10°C, dann 24 Stunden bei 0°C. Nach Eindampfen der Reaktionslösung bei 35°C und 0.01 Torr auf ein Viertel des ursprünglichen Volumens wird die Reaktionslösung auf 20 ml eiskalte, 5-% Zitronensäurelösung gegossen, wobei ein farbloses, amorphes Produkt anfällt. Nach Absaugen und Nachwaschen mit Eiswasser wird getrocknet und aus Ethanol/Essigester/Ether kristallisiert. Ausbeute an Rohprodukt: 1.55 g (96.7 %). Zur Hochreinigung wird die Substanz an LH 20 mit Methanol als Eluens gelchromatographiert.

Ausbeute: 1.29 g (80.47 % d.Th.)
Fp.: 140-145°C
Rf_D: 0.79
$[\alpha]_D^{20}$: + 11.6° (c=1,DMF)
$C_{90}H_{123}N_9O_{13}S$ (1603.04) Ber: C 67.43 H 7.73 N 7.86
Gef: C 66.93 H 7.71 N 7.76

6.1.19. L-Tryptophyl-N^{ε}-tert.-butyloxycarbonyl-L-lysyl-O-tert.-butyl-L-threonyl-L-phenylalanyl-O-tert.-butyl-L-threonyl-O-tert.-butyl-L-seryl-S-trityl-cystein (H-L-Trp-L-Lys(Boc)-L-Thr(Bu^t)-L-Phe-L-Thr(Bu^t)-L-Ser(Bu^t)-L-Cys(Trt)-OH)

100 mg Adpoc-L-Trp-L-Lys(Boc)-L-Thr(Bu^t)-L-Phe-L-Thr(Bu^t)-L-Ser(Bu^t)-L-Cys(Trt)-OH werden in 5 ml einer Eisessig/HCOOH (83 %)/H_2O-Mischung (7:1:2) 2 Stunden lang auf 40°C gehalten. Nach Eingengen der Lösung wird der Rückstand 2 mal mit absolutem Ethanol im Vakuum nachextrahiert. Der ölige Rückstand wird in wenig absolutem Ethanol aufgenommen und dann mit eiskaltem Hexan ausgefällt. Der so erhaltene amorphe Niederschlag wird mit wenig kaltem Hexan nachgewaschen und im Hochvakuum getrocknet.

Ausbeute: 81 mg (86.2 % d.Th.) bez. auf IV)

Fp.: 155°C

Rf (Chloroform/Ethanol,7:3) : 0.41

Elementaranalyse: berechnet für $C_{76}H_{103}N_9S$ mit

	C	H	N	
HCOOH	64.73	7.40	8.82	(I)
CH_3COOH	64.94	7.47	8.73	(II)
$HCOOH.CH_3COOH$	63.74	7.38	8.46	(III)
$HCOOH.CH_3COOH.H_2O$	62.97	7.42	8.36	(IV)
Gef.	62.95	7.28	8.48	

6.2. Darstellung der Sequenz 1-14

6.2.1. N-tert.-Butyloxycarbonyl-L-alanyl-glycyl-S-trityl-L-cysteinyl-N^{ε}-tert.-butyloxycarbonyl-L-lysyl-L-asparaginyl-L-phenylalanyl-L-phenylalanyl-L-tryptophyl-N^{ε}-tert.-butyloxycarbonyl-L-lysyl-O-tert.-butyl-L-threonyl-O-tert.-butyl-L-seryl-S-trityl-L-cystein (Boc-L-Ala-Gly-L-Cys(Trt)-L-Lys(Boc)-L-Asn-L-Phe-L-Phe-L-Trp-L-Lys(Boc)-L-Thr(Bu^t)-L-Phe-L-Thr(Bu^t)-L-Ser(Bu^t)-L-Cys(Trt)-OH)

Zu 138.6 mg (0.1 mMol) Boc-L-Ala-Gly-L-Cys(Trt)-L-Lys(Boc)-L-Asn-L-Phe-L-Phe-$NHNH_2$ in 1.9 ml DMF werden bei -35°C 0.086 ml 2.9 N HCl in THF (0.25 mMol) und 0.031 ml (0.11 mMol) frisch destilliertes tert.-Butylnitrit gegeben. Nachdem der Hydrazidrest negativ ausfällt (20 Minuten), wird noch 5 Minuten weitergerührt, danach neutralisiert man bei dieser Temperatur mit 0.035 ml (0.25 mMol) Triethylamin. Nun fügt man eine Lösung von 157 mg (0.105 mMol) H-L-Trp-L-Lys(Boc)-L-Thr(Bu^t)-L-Phe-L-Thr(Bu^t)-L-Ser(Bu^t)-L-Cys(Trt)-OH und 0.029 ml (0.21 mMol) Triethylamin in 1 ml DMF langsm zu. Nach 2 Stunden bei -20°C läßt man langsam auf -5°C kommen und beläßt bei dieser Temperatur für 24 Stunden. Anschließend wird in eine eiskalte, 0.5 N Zitronensäurelösung eingetropft, wobei ein leicht gelblicher Niederschlag ausfällt. Nach Filtration wird mit Eiswasser gewaschen, der Rückstand getrocknet, schließlich 2 mal aus Me-

thanol/n-Hexan gefällt.

Ausbeute: 227 mg (87.57 % d.Th.)
Fp.: 213-214°C nach LH 20 in Methanol: 223°C
Rf_D: 0.73, Rf (Chloroform/MeOH 7:3): 0.70
$C_{140}H_{182}N_{18}O_{25}S_2$ (2581.12) Ber: C 65.15 H 7.11 N 9.76 S 2.48
Gef: C 64.49 H 7.19 N 9.94 S 2.45

Aminosäureanalyse:
1. 6 N HCl, 18 Stunden, 115°C
2. 6 N HCl, 18 Stunden, 115°C, Zusatz von 2.5 % Thioglycolsäure

	Ala	Gly	Cys	Lys	Asp	Phe	Thr	Ser	Trp
Ber:	1	1	2	2	1	3	2	1	1
Gef.1.	1.0	0.97	1.98+	1.98	1.00	2.85	1.52	0.69	-
Gef.2.	1.0	0.95	0.83	2.09	1.01	2.79	1.70	0.83	0.52

+) Cys wird als Cysteinsäure nach Zitat 147 bestimmt.

6.2.2. L-Alanyl-glycyl-L-cystinyl $^{1-14}$-L-lysyl-L-asparaginyl-L-phenylalanyl-L-phenylalanyl-L-tryptophyl-L-lysyl-L-threonyl-L-phenylalanyl-L-threonyl-L-seryl-L-cystin $^{14-1}$ (Somatostatin)

H-L-Ala-Gly-L-Cys-L-Lys-L-Asn-L-Phe-L-Phe-L-Trp-L-Lys-L-Thr-L-Phe-L-Thr-L-Ser-L-Cys-OH

a) Zu einer stark gerührten Mischung von 25 mg Jod in 5 ml Methanol (0.1mMol) wird bei 22°C innerhalb 40 Minuten eine Lösung von 25 mg (10 µMol) des geschützten Tetradecapeptids in 5 ml Methanol/DMF (4:1)getropft. Danach wird noch eine Stunde bei 22°C gerührt. Nach Ende der Reaktionszeit wird auf 0°C gekühlt, und tropfenweise eine Lösung von 320 mg Ascorbinsäure und 230 mg Ammoniumacetat in 10 ml Wasser bis zur Entfärbung zugetropft (Verbrauch 0.95 ml). Es werden weitere 0.5 ml zugegeben und die Lösung auf ca. 1 ml Volumen eingeengt. Nach Abkühlen auf 0°C wird mit 1 ml n-Hexan versetzt, wobei Entmischung eintritt. Nach Abpipettieren der Hexan-

phase wird dieser Vorgang noch zweimal wiederholt. Der Rückstand wird in 50 ml Chloroform/Methanol (90:10) aufgenommen, die Wasserphase abgetrennt, nochmals mit 5 ml Wasser gewaschen und schließlich nach Trocknen über Natriumsulfat bei 30°C Badtemperatur eingeengt. Die Lyophylisation aus tert.-Butanol ergibt ein farbloses, wattiges Produkt.

Ausbeute: 18.4 mg (87.8 % d.Th.)
Rf_D: 0.52
Negative Reaktion auf Ellman-Reagens

b) 18.0 mg (8.6 µMol) des oxydierten Peptids werden unter Stickstoff und Eiskühlung unter kräftigem Rühren mit 3 ml eiskalter, konz. Salzsäure (p.a.) versetzt. Nach 8 Minuten wird zur Entfernung der gasförmig gelösten HCl bei 0°C 5 Minuten auf 0.01 Torr evakuiert, dann mit 30 ml tert.-Butanol versetzt und lyophilisiert. Das flockig-farblose Produkt wird nun an G 25 mit 2 N Essigsäure als Eluens gelchromatographiert (Elutionsprofil s.S. 87). Fraktion II enthält nach DC und HPLC große Anteile an Somatostatin. Nach Vereinigen der reinen Fraktionen und Gefriertrocknung erhält man 3.9 mg rohes Somatostatin.

- 0.5 mg des so oxidierten Somatostatins werden nun in 50 µl Isopropanol/0.01 m NH_4Ac-Lösung (1:3) gelöst und durch HPLC hochgereinigt (Bedingungen s.S.89). Es werden 0.23 mg eines hochreinen Produktes erhalten, welches identisches Laufverhalten in allen angegebenen DC-Fließmittelsystemen mit einer Referenzprobe zeigt .

Rf-Werte in verschiedenen Lösungsmittelsystemen:
Rf_E: 0.81, Rf_F: 0.1, Rf_G: 0.62, Rf(n-Butanol/Eisessig/Pyridin/Wasser 15:3:10:12): 0.59; Rf (n-Propanol/Pyridin/Wasser/Eisessig/Essigester 5:4:6:1:4): 0.83; Rf (Butanol/Eisessig/Wasser 4:1:5, Oberphase): 0.36.

Ergebnis der Aminosäurenanalyse:

1. Hydrolyse mit 4 N Methansulfonsäure/0.2 % 3-(2-Aminoethyl)indol (22 h bei 115°C)
2. 6 N HCl, 18 h bei 115°C
3. 6 N HCl, 18 h bei 115°C, Zusatz von 2.5 % Thioglycolsäure

	Ala	Gly	Lys	Asp	Phe	Thr	Ser	Cys	Trp
Gef.1.	1.0	1.06	1.92	1.05	2.81	1.77	0.81	1.62	0.6
Gef.2.	1.0	1.00	2.12	1.05	3.00	1.87	0.50	1.59	-
Gef.3.	1.0	1.03	2.09	1.03	2.91	1.83	0.77	0.81	0.56
Ber.	1	1	2	1	3	2	1	2	1

Ergebnis des Racemattests:

Ala: 2.7 %
Lys: 1.6 %
Asp: 3.8 %
Phe: 2.4 %
Thr: 0.39 %
Ser: 3.4 %.

VII. ZUSAMMENFASSUNG

Verschiedene Totalsynthesen von Somatostatin werden beschrieben. Zur Charakterisierung der Zwischenverbindungen werden vorwiegend die ^{13}C-NMR-Spektroskopie und die Felddesorptions-Massenspektrometrie herangezogen. Durch ^{1}H-NMR-spektroskopische Messungen kann gezeigt werden, daß die selektive Abspaltung der N-Carbobenzoxygruppe in Anwesenheit des O-Benzylrestes von Threonin möglich ist. Die Stabilität von Asparagin bei verschiedenen Kupplungsmethoden wird mittels der Infrarotspektroskopie untersucht; dabei wird gefunden, daß die Bildung von ß-Cyanoalanin auch dann auftreten kann, wenn unter sorgfältig gewählten Kupplungsbedingungen (DCC/HOBt, $0^{\circ}C$) gearbeitet wird.

Da die zunächst eingeschlagene Strategie nicht zum gewünschten Erfolg führt, werden systematische Untersuchungen zur Säurelabilität α,α -dimethylsubstituierter Aminoschutzgruppen des Urethantyps durchgeführt. Die auf diese Weise entwickelten neuen Aminoschutzgruppen, die 1-Benzyl-1-methylethoxycarbonyl (Bzpoc)- und die 1-(1-Adamantyl)-1-methylethoxycarbonyl (Adpoc)-Gruppe werden mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) und Dünnschichtchromatographie auf ihr Abspaltungsverhalten unter sauren Bedingungen untersucht. Während die Bzpoc-Gruppe etwa die doppelte Stabilität gegenüber der Boc-Gruppe aufweist, gelingt die Abspaltung der Adpoc-Gruppe in mildem acidolytischen Medium, vorzugsweise 3% Trifluoressigsäure/Methylenchlorid innerhalb 1-2 Minuten bei Raumtemperatur. Unter diesen Bedingungen wird der Adpoc-Rest 700-1500 mal schneller als die Boc-Gruppe abgespalten. Das säurelabile Indolsystem des Tryptophans bleibt dabei vollkommen intakt. Die Abspaltungszeiten in anderen Säuremedien und die Geschwindigkeitskonstanten der nach einer Reaktion 1.Ordnung ablaufenden Abspaltungsreaktion werden angegeben.

Die mittels verschiedener Einführungsreagenzien (Adpoc-Fluorid, Adpoc-ON, Adpoc-OPh) hergestellten Adpoc-Aminosäuren werden durch ^{13}C-NMR und FD-MS charakterisiert; die Stabilität von Adpoc-Tryptophan gegen Lichteinwirkung wird durch UV-Messungen bestätigt. Im Rahmen der Somatostatinteilsequenz 8-14 wird die Eignung der Adpoc-Gruppe als Tryptophanschutzgruppe und als Aminoschutzgruppe bei der Synthese größerer Peptide demonstriert. Dabei zeigt sich, daß der Adpoc-Rest bei den in der Peptidchemie üblichen Methoden (DCC/HOBt-Kupplungen, Azidkupplungen, Verseifungen, Hydrazinolysen, Hydrierungen) vollkommen stabil bleibt. Der ausgeprägte lipophile Charakter der Adpoc-Gruppe führt bei höheren Peptiden zu einer starken Löslichkeitsverbesserung in organischen Lösungsmitteln. Das auf diesem Weg hergestellte geschützte Somatostatin wird durch HF-Anisol-Ethandithiol von allen Schutzgruppen befreit und während 72 Stunden an der Luft oxidiert. Die Feinreinigung wird durch Gelchromatographie an G 25 und LH 20 und durch Ionenaustauschchromatographie an Carboxymethyl-Cellulose vorgenommen. Die Reinheit wird durch Dünnschichtchromatographie in verschiedenen Fließmittelsystemen, durch Elektrophorese und durch HPLC-Messungen kontrolliert.

Alternativ wird eine Abspaltung der Schutzgruppen mit Bortristrifluoracetat (BTFA) und Trifluormethansulfonsäure vorgenommen. Lediglich beim erstgenannten Spaltungsreagens kann Somatostatin in befriedigenden Ausbeuten hergestellt werden.

Die selektive Verwendung der Adpoc-Gruppe in Anwesenheit ausschließlich säurelabiler Schutzgruppen wird am Beispiel des Heptapeptids Adpoc-Trp-Lys(Boc)-Thr(Bu^t)-Phe-Thr(Bu^t)-Ser(Bu^t)-Cys(Trt)-OH demonstriert. Auf diese Weise gelingt die Synthese von geschütztem Somatostatin, welches durch schonende Bedingungen (Iodoxidation mit anschließender Abspaltung durch HCl) zum cyclischen Somatostatin umgesetzt werden kann. Durch Dünnschichtchromatographie in verschiedenen Fließmittelsystemen, durch HPLC-Messungen und

durch Elektrophorese kann gezeigt werden, daß das auf diesem Wege hergestellte Somatostatin mit einer Referenzprobe vollkommen identisch ist.

Die Adpoc-Gruppe kann somit vorteilhaft als sehr säurelabile, lösungsvermittelnde und selektiv abspaltbare Aminoschutzgruppe tryptophanhaltiger Peptide eingesetzt werden.

VIII. Literaturverzeichnis

1. A.V.Schally, Science 202, 18 (1978)
2. R.Guillemin, Science 202, 390 (1978)
3. K.Folkers, N.G.Johansson, F.Hooper, P.Currie, H.Sievertson, J.K.Chang, and C.Y.Bowers, Angew.Chem.85, 271 (1973)
4. D.Gupta und W.Voelter (Eds.), Hypothalamic Hormones-Chemistry - Physiology and Clinical Applications, Verlag Chemie, Weinheim (1978)
5. W.Voelter, Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe 34, 440 (1977)
6. J.Sandow, Medizin in unserer Zeit 3, 2 (1979)
7. G.M.Besser und C.H.Mortimer, J.Clin.Path. 27, 173 (1974)
8. W.Voelter, W.Klingler, P.Göbel und H.Kalbacher, Med.Welt, 29, 1728 (1978)
9. W.F.Ganong, Lehrbuch der medizinischen Physiologie, Springer Verlag, Berlin (1974)
10. A.V.Schally, C.Y.Bowers, T.W.Redding, and F.J.Barett: Biochem.Biophys.Res.Commun. 25, 165 (1966)
11. R.Burgus, T.F.Dunn, D.Desiderio, D.N.Ward, W.Vale und R. Guillemin, Nature 226, 321 (1970)
12. A.V.Schally, A.Arimure, Y.Baba, R.M.G.Nair, H.Matsuo, T.W. Redding, L.Debeljuk and W.F.White, Biochem.Biophys.Res. Commun.43, 393 (1971)
13. M.Amoss, R.Burgus, R.E.Blackwell, W.Vale, R.Fellows and R.Guillemin, Biochem.Biophys.Res.Commun. 44, 205 (1971)
14. A.Weindl, Ärztl.Praxis 61, 2715 (1977)
15. A.J.Prange, I.C.Wilson, P.P.Lara, L.B.Alltrop and G.R. Breese, Lancet 1972, 999
16. A.S.Coppen, M.Montgomery, J.Bailey, V.Marks and P.Woods, Lancet 1974, 433
17. U.Supprian, Pharmakopsychiat. 10, 15 (1977)
18. B.E. Karlber, B.E.Kjellmann and B.Kagedal, Acta psychiat. scand. 58, 389 (1978)
19. R.A.Vogel, B.R.Cooper, T.S.Barlow, A.J.Prange, R.A.Mueller and G.R.Breese, J.Pharm.Exp.Ther. 208, 161 (1979)
20. P.Brazeau, W.Vale, R.Burgus, N.Ling, M.Butcher, J.Rivier

and R.Guillemin, Science 179, 77 (1973)
21. R.Burgus, N.Ling. M.Butcher,and R.Guillemin, Proc.Nat. Acad.Sci. 70, 684 (1973)
22. A.V.Schally, A.Dupont, A.Arimura, T.W.Redding, N.Nishi, G.L.Linthicum, and D.H.Schlesinger, Biochemistry 15, 509 (1976)
23. D.F.Veber, G.Strachan, S.J.Bergstrand, F.W.Holly, C.F. Homnick, R.Horschmann, M.Torchiana, and R.Saperstein, J.Amer.Chem.Soc. 98, 2367 (1976)
24. D.F.Veber, F.W.Holly, W.J.Paleveda, R.F.Nutt, S.J.Bergstrand, M.Torchiana, M.S.Glitzer, R.Saperstein, and R.Hirschmann, Proc.Nat.Acad.Sci. 75, 2636 (1978)
25. B.H.Arison, R.Hirschmann, and D.F.Veber, Biochemistry 7, 447 (1978)
26. G.Benker und D.Reinwein, Dtsch.Med.Wschr.100, 961 (1975)
27. D.Bryce, B.S.M.Yeh, C.Funderburk, H.Todd,and F.Hertelendey, Diabetes 24, 842 (1975)
28. R.Guillemin, and J.E.Gerich, Ann.Rev.Med. 27, 380 (1976)
29. P.M.Dubois, and C.Paulin, Lyon Medical 236, 487 (1976)
30. C.Lucke, H.J.Mitzkat, und A.von zur Mühlen, Klin.Wschr. 54, 293 (1976)
31. B.L.Pimstone, M.Berelowitz,and S.Kronheim, SA Med.Journal 50, 1471 (1976)
32. R.A.Rizza, and J.E.Gerich, Med.Clin. North America 62, 735 (1978)
33. E.Bayer, H.Hagenmaier, G.Jung, W.Parr, H.Eckstein, P. Hunziker und R.E.Sievers, Peptides 1971, 65
34. R.S.Feinberg, and R.B.Merrifield, Tetrahedron 30, 3209 (1974)
35. J.Stewart, J.Macromol.Sci.Chem. A10, 259 (1976)
36. S.B.H.Kent, and R.B.Merrifield, Israel J.Chem. 17, 243 (1978)
37. S.B.H.Kent, A.R.Mitchell, M.Engelhard, and R.B.Merrifield, Proc.Nat.Acad.Sci. USA 76, 2180 (1979)
38. E.Wünsch in Methoden der Organischen Chemie (Houben-Weyl-Müller), Band XV/1, Thieme, Stuttgart 1974

39. H.Kalbacher und W.Voelter, Angew.Chem.90, 998 (1978); Angew.Chem.Int.Ed.17, 944 (1978)
40. W.Voelter und H.Kalbacher, 6th American Peptide Symposium, June 17-22, 1979, Georgetown, Washington DC
41. H.Kalbacher und W.Voelter, Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 360, 1161 (1979)
42. W.Voelter und H.Kalbacher, J.C.S.Chem.Commun., im Druck
43. J.Rivier, P.Brazeau, W.Vale, N.Ling, R.Burgus, C.Gilon, J.Yardley, and R.Guillemin, Compt.rend.Acad.Sci. 276, 2737 (1973)
44. D.Yamashiro, and C.H.Li, Biochem.Biophys.Res.Commun.54, 882 (1973)
45. J.E.F.Rivier, J.Amer.Chem.Soc. 96, 2986 (1974)
46. C.Birr (1976) in Peptides 1976, Loffet, A., Ed.Editions de l'Université de Bruxelles, Brüssel, p. 451
47. J.Rivier, R.Kaiser, and R.Galyean, Biopolymers 17, 1927 (1978)
48. D.Sarantakis, and W.A.McKinley, Biochem.Biophys.Res. Commun. 54, 234 (1973)
49. H.U.Immer, K.Sestanj, V.R.Nelson, and M.Götz, Helv.Chim. Acta 57, 730 (1974)
50. N.Fujii, and H.Yajima, Chem.Pharm.Bull. 23, 1596 (1975)
51. W.Bauer und J.Pless (1975) in Peptides: Chemistry, Structure, and Biology, Walter, R. und J.Meienhofer, Eds, Ann Arbor Science Publishers, pp. 341
52. A.M.Felix, M.H.Jimenez, T.Mowles, and J.Meienhofer, Int.J.Peptide Res. 11, 329 (1978)
53. H.Kalbacher, C.Bürvenich, S.Fuchs, H.Horn, W.Klingler, E.Pietrzik, K.Zech und W.Voelter, Z.Naturforsch.31b, 1702 (1976)
54. L.A.Holladay, J.Rivier, and D.Puett, Biopolymers 16, 4895 (1977)
55. N.L.Benoiton, K.Kuroda, and F.M.F.Chen, Int.J.Peptide Res. 13, 403 (1979)
56. M.Goodman, P.Keogh, and H.Anderson, Bioorganic Chemistry 6, 239 (1977)
57. A.Arendt, A.M.Kolodziejczyk, and T.Sokolowska, Pol.J. Chem. 52, 1959 (1977)

58. A.Kolodziejczyk, and A.Arendt, Pol.J.Chem. 53, 611 (1979)
59. E.Bayer und M.Mutter, Chem.Ber. 107, 1344 (1974)
60. M.Mutter, Dissertation, Universität Tübingen (1973)
61. M.Schattenberg, Dissertation, Universität Tübingen (1975)
62. J.Izdebski,Rocz.Chem.49, 1o97 (1975)
63. W.König und R.Geiger, Chem.Ber. 103, 788 (1970)
64. Y.S.Klausner,and M.Bodansky, Synthesis 1972, 453
65. R.S.Rapaka, R.S.Bhatnagar, and D.E.Hitecki, Biopolymers 15, 1585 (1976)
66. W.König und R.Geiger, Chem.Ber. 106, 3626 (1973)
67. M.Bodansky, N.Chandramouli, and J.Martinez, J.Med.Chem.22, 270 (1979)
68. J.Honzl, und J.Rudinger, Collect.Czech.Chem.Commun. 26, 2333 (1961)
69. Y.S.Klausner and M.Bodanszky, Synthesis 1974, 549
70. H.Horn, Dissertation, Universität Tübingen (1980)
71. H.D.Jakubke und H.Jeschkeit, Akademie-Verlag, Berlin 1973
72. H.Kunzek, Ch.Seidel und G.Frache, Z.Chem. 15, 58 (1975)
73. W.König und K.Kernebeck, Liebigs Ann.Chem. 1979, 227
74. E.Wünsch, persönliche Mitteilung
75. J.Izdebski, S.Drabarek,and M.Lebek,Rocz.Chem. 49, 1535 (1975)
76. J.Izdebski, M.Lebek, and S.Drabarek,Rocz.Chem. 51, 81 (1977)
77. W.Voelter, C.Bürvenich, H.Horn, H.Kalbacher und E.Pietrzik, Angew.Chem. 88, 332 (1976), Angew.Chem.Int.Ed. 15, 297 (1976)
78. W.Voelter, E.Pietrzik und H.Kalbacher, Tetrahedron Letters 25, 2119 (1976)
79. B.Kamber, und W.Rittel, Helv.Chim.Acta 51, 2o61 (1968)
80. E.Schnabel, J.Stollefuß, H.A.Offe und E.Klauke, Liebigs Ann.Chem. 743,57 (1971)
81. W.König und R.Geiger, Chem.Ber. 103, 2041 (1970)
82. H.R.Bosshard, Helv.Chim.Acta 54, 951 (1971)
83. V.M.Monnier, Helv.Chim.Acta 59, 348 (1976)
84. U.Weber und H.Schmid, Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 357, 1359 (1976)

85. J.Honzl und J.Rudinger, Collect,Czech.Chem.Commun. 26, 2333 (1961)
86. H.Zahn und D.Brandenburg, Liebigs Ann.Chem.692, 220 (1966)
87. E.Wünsch, A.Zwick und A.Fontana, Chem.Ber. 101, 326 (1968)
88. R.Geiger, Persönliche Mitteilung
89. G.Jung und H.Brückner, Persönliche Mitteilung
90. J.Meienhofer und K.Kuromizu, J.Amer.Chem.Soc. 96, 4978 (1974)
91. G.Losse, Z.Chem. 18, 33o (1978)
92. A.M.Felix, E.P.Heimer, Th.J.Lambros, Ch.Tzougraki und J.Meienhofer, J.Org.Chem. 43, 4194 (1978)
93. E.Breitmaier und W.Voelter, ^{13}C-NMR-Spectroscopy, Verlag Chemie, Weinheim, 1974
94. E.Wünsch, E.Jäger, L.Kisfaludy und M.Löw, Angew.Chem. 89, 330 (1977)
95. E.Jäger, P.Thamm, S.Knof und E.Wünsch, Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 359, 1629 (1978)
96. P.Sieber und W.Rittel, Persönliche Mitteilung
97. P.Sieber und B.Iselin, Helv.Chim.Acta 51, 622 (1968)
98. C.Birr, Liebigs Ann.Chem. 763, 162 (1972)
99. P.Sieber und B.Iselin, Helv.Chim.Acta 51, 614 (1968)
100. A.T.Kyi, und R.Schwyzer, Helv.Chim.Acta 59, 1642 (1976)
101. W.L.Haas, E.V.Krumkalns und K.Gerzon, J.Amer.Chem.Soc. 88, 1988 (1966)
102. D.J.Raber, R.C.Fort, E.Wiskott, C.W.Woodworth, P.v.R. Schleyer, Tetrahedron 27, 3 (1971)
103. E.Breitmaier und G.Bauer, ^{13}C-NMR-Spektroskopie, G.Thieme-Verlag, Stuttgart 1977
104. J.E.Rivier, J.Liquid Chrom. 1, 343 (1978)
105. K.Krummen und R.W.Frei, J.Chrom. 132, (1977)
106. J.T.M.Bakkum, H.C.Beyermann, P.Hoogerhout, C.Oliemann und D.Voskamp, Rec.Trav.Chim.Pays-Bas 96, 302 (1977)
107. J.E.Rivier, R.Wolbers und R.Burgus, Peptides Proc.of the fifth American Peptide Symposium, Ed.M.Goodmann und J. Meienhofer, Wiley and Sons 1977
108. J.A.Riddick, and W.B.Bunger, Organic Solvents, Physical Properties and Methods of Purification, New York (197o)
109. L.A.Carpino, C.A.Giza, and B.A.Carpino, J.Amer.Chem.Soc. 81, 955 (1957)

110. M.Bergmann und L.Zervas, Chem.Ber. 65, 1192 (1932)
111. H.Kalbacher, Diplomarbeit, Universität Tübingen, 1975
112. E.Schnabel, Liebigs Ann.Chem. 702, 188 (1967)
113. S.Visser, J.Roeloffs, K.E.T.Kerling, and E.Havinga, Rec.Trav.Chim.Pays-Bas 87, 559 (1968)
114. T.Mizoguchi, G.Levin, D.Woolley, and J.Stewart, J.Org. Chem.33, 903 (1968)
115. K.Okawa, Bull.Chem.Soc.Jap. 30, 976 (1957)
116. A.A.Costopanagiotis, J.Org.Chem. 33, 1261 (1968)
117. E.Eckstein, R.E.Sievers und E.Bayer, Liebigs Ann.Chem. 1973, 1467
118. R.Schwyzer und W.Rittel, Helv.Chim.Acta 44, 159 (1961)
119. R.Oekonomopulos, Dissertation, Tübingen, 1978
120. Anfärbereagenzien für Dünnschicht- und Papierchromatographie, Firmenschrift der Fa.Merck, Darmstadt, 1970
121. H.Stetter, M.Schwarz und A.Hirschhorn, Chem.Ber. 92, 1629 (1959)
122. Beilstein VI, 523
123. H.Klages, Chem.Ber. 37, 1721 (1904)
124. W.Anderson, J.E.Zimmermann, and F.M.Callahn, J.Amer. Chem.Soc. 86, 1839 (1964)
125. H.P.Hartter, Dissertation, Universität Tübingen (1973)
126. D.Stevenson, and G.T.Young, J.Chem.Soc.(C) 1969, 2389
127. L.Wackerle und I.Ugi, Synthesis 1975, 598
128. M.Itoh,D.Hagiwara und T.Kamiya, Bull.Chem.Soc. Jap.50, 718 (1977)
129. M.Itoh, D.Hagiwara und T.Kamiya, Tetrahedron Lett.49, 4393 (1975)
130. H.Ertel und L.Hamer, J.Chrom.7, 268 (1962)
131. E.L.Smith, J.Biol.Chem. 175, 39 (1948)
132. G.Ellman , Arch.Biochem.Biophys. 82, 70 (1959)
133. L.A.Holt, B.Milligan, D.E.Rivett u. F.H.C.Stewart, Biochim.Biophys.Acta 499, 131 (1977)
134. S.Guttmann und R.A.Boissonas, Helv.Chim.Acta 41, 1852 (1958)
135. E.Wünsch und J.Jentsch,Chem.Ber. 97, 2390 (1964)

136. E.Schröder, Liebigs Ann.Chem. 670, 127 (1963)
137. E.Schröder, H.Gibian, Liebigs Ann.Chem. 656, 190 (1962)
138. E.Wünsch, in Methoden der organischen Chemie (Houben-Weyl-Müller), Band XV/2, Thieme, Stuttgart 1974
139. H.Yajima, N.Fuji, H.Ogawa und H.Kawatani, J.C.S.Chem. Comm. 1974, 107
140. J.Pless und W.Bauer, Angew.Chem. 85, 142 (1973)
141. H.Ogawa, T.Sasaki, H.Ino und H.Yajima, Chem.Pharm.Bull. 26, 3144 (1978)
142. Y.Omori, Y.Matsuda, S.Aimoto, Y.Shimonishi und M.Yomamoto, Chem.Lett. 1976, 805
143. G.Losse und W.Naumann, J.prakt. Chem. 320, 651 (1978)
144. H.Brückner, Diplomarbeit, Universität Tübingen, 1977
145. W.Bauer, Sandoz AG., persönliche Mitteilung
146. Ref. 138, S. 539
147. Protein Sequence Determination, edited by Saul B.Needleman, Springer Verlag, Berlin 1975
148. K.Vogler und P.Lanz, Helv.Chim.Acta 43, 270 (1960)
149. M.Ruttenberg, J.Amer.Chem.Soc. 90, 5598 (1968)
150. H.Frank,G.J.Nicholson und E.Bayer, J. Chromat.Sci. 15, 174 (1977)

L E B E N S L A U F

Name	Hubert Kalbacher
Geburtstag, -ort:	28.08.1950 Rottweil/Neckar
Eltern:	Eugen Kalbacher und Frida Kalbacher geb. Teufel
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Schulbesuch:	
1957-1961	Grundschule Rottweil-Altstadt
1961-1969	Leibniz-Gymnasium Rottweil
9.6.1969	Ablegung der Reifeprüfung
Studium:	
WS 69/70	Immatrikulation für Chemie an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
März 1972	Abschluß des Vordiploms
Juli 1974	Mündliche Diplomprüfung
Sept.1974-Mai 1975	Diplomarbeit: Synthesen,Strukturuntersuchungen und Aktivitäten C-terminal veränderter Derivate des TRH
SS 73	Immatrikulation für Medizin
9.4.1976	Eheschließung mit Ursula Wilhelm aus Freiburg
August 1976	Ablegung der ärztlichen Vorprüfung
Sept. 1976-August 1978	Wissenschaftlicher Angestellter an der Med.Univ.Poliklinik Tübingen (Gaschromatische Untersuchungen von Steroiden im Urin und Plasma)
August 1975-Sept. 1979	Praktischer Teil der Doktorarbeit: "Synthesen von Somatostatin mit einer neuentwickelten säurelabilen Schutzgruppe" unter der Leitung von Prof.Dr.W. Voelter am Institut für Organische Chemie der Universität Tübingen

Meine akademischen Lehrer waren:
E.Bayer, W.Braun, E.Breitmaier, G.Häfelinger, H.Hagenmaier, G.Jung. S.Kemmler-Sack, W.König, H.Krüger, D.Krug, E.Lindner, H.Mauser, E.Müller, D.Oelkrug, H.Pauschmann, G.Pausewang, A.Rieker, W.Rüdorff, W.Rundel, W.Schweizer, F.F.Seelig, J.Strähle, E.Stumpp, H.Suhr und W.Zeil (Chemie)

A.Arnold, E.Betz, H.Feneis, W.Graumann, J.Guglielmi,R.Jacob, K.Mörike und G.Weitzel (Medizin)

Offsetdruck
GmbH & Co. KG
86 Bamberg · Hohe-Kreuz-Str 06

M. SCHADEL
· Tel. 0951/54414 - 58461 ·